

THÈSE

présentée à
l'UNIVERSITÉ DE NANCY
pour obtenir
le grade de Docteur Ingénieur
par

Christian SCHVARTZ

EVOLUTION DES HYDROSOLUBLES DE LITIERES DE CALLUNE ET DE HETRE AU COURS DU PROCESSUS D'HUMIFICATION

Soutenue publiquement le 10 Janvier 1975, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

MM. Ph. DUCHAUFOR	Président	
F. JACQUIN	}	Examineurs
M. METCHE		
S. BRUCKERT		

AVANT - PROPOS

THÈSE

présentée à

l'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour obtenir

le grade de Docteur Ingénieur

par

Christian SCHVARTZ

EVOLUTION DES HYDROSOLUBLES DE LITIÈRES DE CALLUNE ET DE HÊTRE AU COURS DU PROCESSUS D'HUMIFICATION

Soutenue publiquement le 10 Janvier 1975, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

MM. Ph. DUCHAUFOUR
F. JACQUIN
M. METCHE
S. BRUCKERT

Président

Examineurs

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DE NANCY

pour obtenir

le Grade de Docteur Ingénieur

par

Christian SCHWARTZ

EVOLUTION DES HYDROSOLUBLES

DE LITERES DE CALUNE ET DE METRE

AU COURS DE L'ESSAI D'HUMIFICATION



Soutenue publiquement le 10 Janvier 1972, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury

Président	M. P. DUCHAURON
Examineurs	F. JACQUIN
	M. METCHE
	S. BRUCKERT

AVANT - PROPOS

Avant toute chose, je tiens à remercier Monsieur BOULAIN, Professeur à l'I.N.A. Paris-Grignon, qui m'a fait découvrir et apprécier la pédologie. C'est lui qui par sa passion pour cette science et son sens de la pédagogie a suscité en moi le désir d'aller au-delà de la formation, forcément limitée, qu'il pouvait donner en un certain nombre d'heures de cours.

Pour cela, je suis profondément reconnaissant à Monsieur le Professeur DUCHAUFOR, Directeur du Centre de Pédologie biologique à NANCY, qui a bien voulu me faire la confiance de m'accepter dans son laboratoire en me proposant ce thème de recherche. Malgré ses lourdes tâches, il a guidé mes premiers pas de chercheur en suivant l'évolution de mes recherches et en me faisant profiter de ses remarques.

Je remercie sincèrement Monsieur JACQUIN, Professeur à l'I.N.P. qui a accepté de se faire le rapporteur de ce travail. Sa rigueur d'analyse et la pertinence de ses conseils, sans oublier ses encouragements, m'ont été d'un grand secours.

Je dois également beaucoup à Monsieur BRUCKERT, qui a suivi avec attention la progression de cette étude, et m'a fait bénéficier largement de ses critiques et de ses suggestions. Je l'en remercie vivement.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur METCHE, critique compétent en matière de biochimie des sols, qui a bien voulu participer au jury.

Je n'oublierai pas non plus ce que m'ont apporté mes amis, chercheurs et techniciens du Centre de Pédologie : M. ANDREUX, Mlle CHONE, MM. GUILLET, HUC, MERLET, Mlle MONROZIER, MM. N'GUYEN QUAT HAO, PORTAL, TOUTAIN, VEDY, Mlle WEBER. Je leur dois des discussions enrichissantes et des remarques constructives qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Enfin, je suis reconnaissant à Madame JEANROY et à Monsieur SUEUR de leur amabilité et de la célérité avec laquelle ils ont su réaliser la dactylographie et l'illustration de ce mémoire.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : MATERIEL ET METHODES

I.- MATERIEL D'ETUDE

1.- Les stations

2.- Extraction et conservation des hydrosolubles

II.- METHODES D'ETUDE

1.- Chromatographie sur gel

2.- Absorption en lumières visible et ultraviolette

3.- Hydrolyses acides

4.- Analyses biochimiques

5.- Incubations

6.- Comptages de radioactivité

7.- Extraction

DEUXIEME PARTIE : COMPOSITION DES HYDROSOLUBLES EXTRAITS DES DEUX LITIERES

I.- COMPOSITION ELEMENTAIRE

1.- Carbone - Azote

2.- Cations

3.- pH et acidité titrable

II.- ENCOMBREMENT MOLECULAIRE DES COMPOSES HYDROSOLUBLES

III.- CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES PRINCIPAUX COMPOSES HYDROSOLUBLES

1.- Etude générale : densité optique

2.- Composition phénolique

3.- Acides aminés

IV.- CONCLUSION

TROISIEME PARTIE : EVOLUTION DES COMPOSES HYDROSOLUBLES PAR INCUBATION EN MILIEU LIQUIDE

I.- DEGRADATION MICROBIENNE

II.- TRANSFORMATIONS MICROBIENNES

1.- Bilan du carbone

2.- Bilan de l'azote

3.- Comparaison carbone-azote

4.- Evolution du pH	40
5.- Encombrement moléculaire	41
6.- Densité optique	44
7.- Evolution des composés phénoliques simples	47
8.- Evolution des acides aminés	49
III.- CONCLUSION	51
CINQUIEME PARTIE : EVOLUTION DES HYDROSOLUBLES EN PRESENCE DE SOL ET DE TRACEURS RADIOACTIFS	57
I.- PROTOCOLE EXPERIMENTAL	58
II.- BILAN DU CARBONE AU TERME DE L'INCUBATION	59
III.- RESPIROMETRIE : CO ₂ et ¹⁴ CO ₂ DEGAGES	59bis
1.- Minéralisation des hydrosolubles seuls	61
2.- Minéralisation des hydrosolubles enrichis en glycine	61
3.- Minéralisation des hydrosolubles enrichis en composés phénoliques	63
4.- Minéralisation de la molécule de glycine	65
5.- Minéralisation de la molécule d'hydroquinone	65
6.- Minéralisation de la molécule d'acide benzoïque	66
7.- Discussion	67
IV.- HUMIFICATION	69
1.- Humification des extraits de litières seuls	69
2.- Humification des extraits enrichis	69
3.- Humification des molécules marquées	70
V.- CONCLUSION	76
CONCLUSIONS	79
BIBLIOGRAPHIE	

INTRODUCTION

Un sol est formé par l'interaction - dans des conditions climatiques et topographiques données - entre une roche et une végétation. Mais ces deux éléments fondamentaux ne pourraient pratiquement pas réagir entre eux sans l'aide de l'eau agissant comme moyen de transport d'éléments du milieu organique, constitué par les végétaux et la litière, vers les horizons plus profonds. En effet, les litières sont capables de libérer à chaque pluie de nombreuses substances organiques hydrosolubles qui vont constituer une part importante de l'approvisionnement en matière organique du sol (NIKVIST, 1959 ; JACQUIN et BRUCKERT, 1965 ; JUNG et al., 1968).

Ces produits hydrosolubles ont une très grande importance dans la pédogénèse : selon leur nature, selon leur concentration, ils seront plus ou moins agressifs vis-à-vis du milieu minéral à travers lequel ils vont percoler, ils seront facilement entraînés en profondeur, ou bien ils seront bloqués près de la surface. La pédogénèse sera ainsi influencée dans un sens ou un autre. Ces propriétés des hydrosolubles sont déterminées par la nature de la végétation dont ils proviennent : les biosynthèses qui s'effectuent dans les espèces végétales sont fonction du génotype de chaque espèce, elles ne sont donc pas forcément les mêmes (en nature et surtout en importance) chez tous les végétaux. Deux grandes tendances se sont ainsi dessinées : l'une regroupant les espèces acidifiantes qui favorisent la formation de mor ou moder ; l'autre les espèces améliorantes auxquelles sont liés les mull. Entre ces deux groupes, se situent un certain nombre d'espèces dites "ambivalentes" qui peuvent présenter soit un caractère acidifiant, soit un caractère améliorant, selon les conditions du milieu (roche-mère, etc.).

Dès 1954, HANDLEY a montré que, dans les espèces qui engendrent des mor, certains composés dits tannants fixent les protéines, les soustrayant ainsi à l'action microbienne, et forment des complexes, souvent peu solubles, qui imprègnent les membranes des cellules des résidus végétaux et retardent leur décomposition. En 1961, ce même auteur oppose les tannins "hydrolysables" des plantes améliorantes aux tannins "condensés" libérés par les plantes acidifiantes, telle la Callune ; les premiers n'empêchent pas la caséine de se décomposer, à la différence des seconds.

COULSON et al. (1960) mettent l'accent sur l'action indirecte du milieu extérieur, notamment le pH et la richesse en bases, sur l'évolution particulière des acides phénols d'une même espèce, telle que le Hêtre : en effet, les feuilles de Hêtre offrent la particularité de donner naissance tantôt à un mull, tantôt à un moder, voire à un mor, suivant les conditions de milieu ; si le pH est suffisamment élevé, les acides phénols subissent une polymérisation rapide et perdent leur action tannante, ce qui se produit dans un mull ; en milieu acide au contraire, l'effet tannant est maintenu (mor). En 1964, ces auteurs ont précisé que le seuil de pH induisant une évolution ou l'autre, se situait aux environs de 5 : en dessous de cette valeur, la décomposition des protéines est considérablement freinée ; au-dessus, elle peut au contraire se

poursuivre normalement. Par une expérience comparable à celle de HANDLEY, ils arrivent à une conclusion analogue : les tannins hydrolysables ne protègent pas la gélatine contre l'action de la trypsine, à l'inverse des tannins condensés (catéchols par exemple).

Au cours de ce travail, nous avons cherché à connaître la nature des composés hydrosolubles hérités provenant de deux végétaux ayant un rôle différent dans les processus pédogénétiques : *Calluna vulgaris* et *Fagus sylvatica* ; pour ce dernier, nous avons tenté de déterminer l'importance du facteur stationnel en comparant deux stations différentes. Après avoir déterminé qualitativement et quantitativement les grandes caractéristiques biochimiques des hydrosolubles, nous avons abordé avec plus de détails l'étude des composés phénoliques et des acides aminés qu'ils contiennent.

Comme nous l'avions remarqué dans la bibliographie, les différentes interactions phénols-protéines (ou phénols-acides aminés) peuvent influencer l'évolution biochimique des extraits de litières au cours des processus d'humification. Aussi, il nous a paru intéressant de suivre le devenir de certains de ces composés au cours d'incubation in vitro en milieu liquide : cette étude en modèle avait essentiellement pour but de donner une indication sur l'orientation des principaux types d'évolution.

Enfin, pour nous replacer dans un contexte plus pédologique, nous avons procédé à une incubation en présence d'un sol ; dans ce cas, nous avons en outre enrichi les hydrosolubles à l'aide de molécules radioactives à caractère aromatique ou aminé. A ce niveau, il nous a paru intéressant de relier ces travaux sur des extraits hydrosolubles de litières considérées comme acidifiantes ou ambivalentes, à ceux d'une litière améliorante (*Festuca sylvatica*).

PREMIERE PARTIE

MATERIEL ET METHODES



MATERIEL ET METHODES

I.- MATERIEL D'ETUDE

Les hydrosolubles ont été extraits à partir de végétaux provenant de quatre stations différentes (Figure 1).

1.- Les stations

a.- Callune

Les fragments de Callune ont été prélevés à la station de Biffontaine (d'après GUILLET, 1972).

Localisation : E = 6°48'32" ; N = 48°12'46" (1/50 000 BRUYERES-BIFFONTAINE)

Topographie : Pente 30 % - bas de pente - exposition Sud - altitude 520 m.

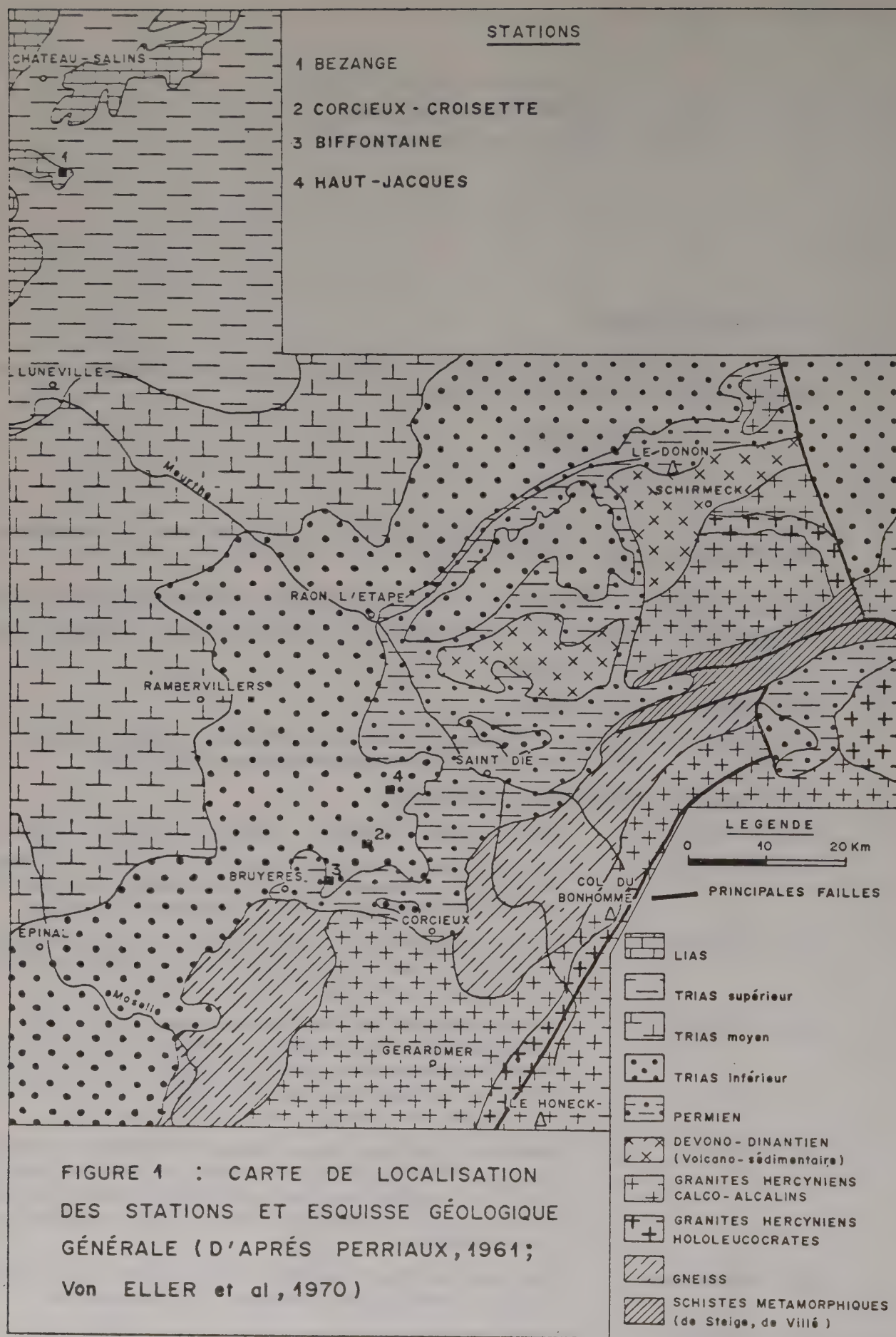
Climat : P = 1 080 mm ; T = 8°8.

Roche-mère : Grès vosgien.

Végétation : Pineraie (*Pinus silvestris*) ; *Calluna vulgaris*, *Vaccinium myrtillus*, *Pteridium aquilinum*, *Sorothamnus scoporinus*.

Description : PODZOL HUMO-FERRUGINEUX

- | | |
|------------------------------|--|
| A ₀ (0-12 cm) | : Mor fibreux, brun noir. Nombreuses racines d'Ericacées. |
| A ₁ (12-17 cm) | : Horizon organique gris sombre (5 YR 2/2). Structure particulaire. Texture sableuse. Abondantes racines et radicules d'Ericacées. Limite progressive avec A ₂ . |
| A ₂ (17-70 cm) | : Horizon minéral gris cendré (5 YR 3/1). Structure particulaire. Texture sableuse, sans cohésion friable. Limite nette avec B _h . |
| B _h (70-75 cm) | : Horizon organique brun-rouge sombre (2,5 YR 3/4). Structure pelliculaire. Texture sableuse, très meuble. Enrobage organique des grains de quartz. Natte de radicules fines au contact de l'alté sous-jacent et autour des rares galets de quartz. Limite nette avec B _s . |
| B _s (75-85 cm) | : Horizon aliotique jaune orangé (5 YR 5/8). La matière organique diffuse en minces filets de couleur plus foncée (5 YR 4/6) affectant les zones structurales de moindre résistance. Très rares racines. Limite progressive avec la roche-mère. |
| B _s C (85-100 cm) | : Horizon de transition brun jaune (5 YR 6/6). Meuble. Racines et radicules devenant plus nombreuses. |
| C (> 100 cm) | : Grès vosgien altéré en place, rose (10 YR 4/4), friable. |



Caractères physicochimiques.

Prof.	Hor.	Granulométrie %						C %	N %	C/N	pH
		S.G.	S.F.	L.G.	L	A	M.O.				
0- 12	A ₀						79,2	39,6	1,016	39	3,8
12- 17	A ₁	77,9	11,3	1,5	4,2	1,9	2,5	1,2	0,047	27	3,4
17- 70	A ₂	79,2	13,0	1,9	4,1	1,3	0,5	0,2	0,013	20	3,7
70- 75	B _h	63,6	11,3	1,5	5,0	12,4	4,8	2,4	0,079	30	3,6
75- 85	B _s	64,7	13,3	2,8	4,4	4,0	4,4	2,2	0,054	40	3,9
85-100	B _s C	66,3	22,3	1,6	3,3	3,7	1,2	0,6	0,023	26	3,9
> 100	C	64,3	25,0	1,9	3,1	4,6	0,5	0,2	0,011	23	3,9

Prof.	Hor.	Bases échangeables m.e./100g					100 $\frac{S}{T}$	Sesq.libres %.		
		Ca	Mg	K	S	T		Fe	Al	Si
0- 12	A ₀	2,01	0,74	0,27	3,02	43,7	6,9	1,1	1,0	0,8
12- 17	A ₁	0,30	0,06	0,08	0,44	4,9	9,0	1,8	1,0	0,8
17- 70	A ₂	0,31	0,08	0,06	0,45	1,5	30,0	0,8	0,4	0,4
70- 75	B _h	0,27	0,06	0,13	0,46	15,7	2,9	5,2	5,3	0,6
75- 85	B _s	0,32	0,08	0,11	0,51	16,6	3,1	5,4	16,0	4,2
85-100	B _s C	0,48	0,19	0,34	1,01	3,7	27,3	2,6	7,4	2,6
> 100	C	0,40	0,09	0,11	0,60	1,9	31,6	2,2	1,5	0,6

b.- Hêtre

Nous avons choisi deux stations de Hêtre correspondant à des sols acides, mais situés dans des conditions de climat et de roche-mère sensiblement différentes. Cela permet de prolonger la comparaison de deux hêtraies situées sur des sols à tendances opposées (TOUTAIN, 1974 ; HANRION, 1974).

- BEZANGE (d'après TOUTAIN, 1972)

Localisation : E = 6°31'36" - N = 48°44'52" (1/50 000 PARROY-ARRACOURT).

Topographie : Replat de sommet - pente faible = 20 % vers le sud - Altitude 295 m.

Climat : P = 750 mm - T = 9°9.

Roche-Mère : Grès rhétien.

Végétation : Hêtraie-Chênaie à prédominance de Hêtre ; *Pteridium aquilinum*, *Ionocera periclimenum*, *Luzula albida*.

Description : SOL PODZOLIQUE

Litière de feuilles de Hêtre.

- A₁ (0-6 cm) : Horizon humifère, gris brunâtre clair (7,5 YR 5/1). Structure grumeleuse fine, assez marquée à l'état sec. Texture sableuse. Limite sinueuse assez nette avec A₂. Petites racines.
- A₂ (6-30 cm) : Brun grisâtre à l'état humide (5 YR 5/2) et gris clair à l'état sec, présentant au printemps et en hiver de fines zébrures horizontales plus foncées (5 YR 4/3). Structure particulaire. Texture sableuse. Limite sinueuse avec B_h. Peu de racines.
- B_h (30-35 cm) : Horizon humifère brunâtre (7,5 YR 4/3) avec taches brun foncé. Structure pelliculaire nette. Texture sableuse. Limite peu nette avec B_s. Nombreuses racines fines.
- B_s (35-55 cm) : Horizon brun jaunâtre (10 YR 5/8) bien homogène. Structure pelliculaire. Texture sableuse. Limite peu nette avec la roche-mère. Racines très peu nombreuses.
- C (> 55 cm) : Roche-mère jaune orange (10 YR 6/4), sableuse, avec des couches horizontales plus compactes et plus ou moins claires. Nombreux petits blocs ferrugineux aplatis peu friables.

Caractères physicochimiques.

Prof.	Hor.	Granulométrie %						C %	N %	C/N	pH
		S.G.	S.F.	L.G.	L	A	M.O.				
0- 6	A ₁	0,6	77,7	1,0	4,9	1,2	14,6	7,3	0,408	18	3,5
6-30	A ₂	1,0	88,7	2,9	5,1	1,5	0,6	0,3	0,023	13	3,6
30-35	B _h	1,0	81,6	3,0	6,6	5,6	2,4	1,2	0,068	18	3,2
35-55	B _s	1,2	83,0	3,0	5,3	6,3	1,2	0,6	0,032	19	3,5
> 55	C	1,2	83,9	2,8	6,0	5,5	0,6	0,3	0,023	13	3,8

Prof.	Hor.	Bases échangeables m.e./100g					$100 \frac{S}{T}$	Sesq. libres %		
		Ca	Mg	K	S	T		Fe	Al	Si
0- 6	A ₁	4,70	0,40	0,48	5,58	20,2	27,6	2,4	0,5	0,6
6-30	A ₂	0,29	0,07	0,02	0,38	1,5	24,4	1,4	0,1	0,6
30-35	B _h	0,27	0,07	0,09	0,43	7,1	6,1	5,0	1,0	0,6
35-55	B _s	0,23	0,05	0,06	0,34	5,2	6,5	4,0	1,6	0,6
> 55	C	0,33	0,05	0,05	0,43	4,4	9,8	3,6	1,2	0,8

- CORCIEUX-CROISETTE

Localisation : E = 6°50'29" - N 48°13'14" (1/50 000 GERARDMER-LA HOUSIERE)

Topographie : Pente moyenne 20 % vers le Nord-Est - Altitude 600 m.

Climat : P = 1 100 mm ; T = 8°6.

Roche-mère : Grès vosgien (colluvium).

Végétation : Sapinière, Hêtre, Pin ; *Ilex aquifolium*, *Sorbus aucuparia*, *Vaccinium myrtillus*, *Deschampsia flexuosa*, *Mastigobryum trilobatum*, *Hypnum loreum*, *Melampyrum pratense*.

Description : PODZOL FERRUGINEUX

- A₀ (0-5 cm) : Mor humifié noir formé surtout de mousses. Litière de feuilles sous les Hêtres.
- A₁ (5-15 cm) : Horizon humifère gris sombre (5 YR 3/2). Structure particulière. Texture sableuse. Quelques fines radicelles. Limite irrégulière et denticulée avec A₂.
- A₂ (15-65 cm) : Horizon gris terne (5 YR 5/1). Structure particulière. Texture sableuse. Racines peu nombreuses. Pas de cailloux. Limite irrégulière et peu nette avec B_h.
- B_h (65-67 cm) : Horizon organique d'épaisseur irrégulière (0 à 5 cm), marron (5 YR 4/4). Structure pelliculaire. Texture sableuse. Faible enrobage des grains de quartz. Limite nette avec B_s.
- B_s (67-90 cm) : Horizon brun ocreux (5 YR 5/6), meuble, compact par place. Structure pelliculaire. Consistance gluante à l'état humide. Quelques grosses racines. Pas de cailloux.
- B_sC (90-105 cm) : Horizon de transition plus clair (5 YR 5/8) meuble et friable
- C (> 105 cm) : Roche-mère orangée (5 YR 6/4), sableuse, localement plus limoneuse.

Caractères physicochimiques.

Prof.	Hor.	Granulométrie %						C %	N %	C/N	pH
		S.G.	S.F.	L.G.	L	A	M.O.				
0- 5	A ₀						31,0	15,9	0,566	27	3,6
5- 15	A ₁	73,0	11,9	0,5	8,8	2,3	5,4	2,7	0,142	17	3,6
15- 65	A ₂	75,6	12,9	1,2	5,5	2,2	0,8	0,4	0,02	20	4,0
65- 67	B _h	65,3	12,4	1,2	7,0	9,8	1,8	0,9	0,05	18	3,9
67- 90	B _s	61,6	13,1	1,4	6,5	11,9	2,9	1,4	0,04	35	4,0
90-105	B _s C	59,0	18,0	3,0	8,5	6,3	1,6	0,8	0,03	26	4,2
> 105	C	71,0	9,0	3,0	7,2	7,3	0,2	0,1	0,002		4,4

Prof.	Hor.	Bases échangeables m.e./100g					100 $\frac{S}{T}$	Sesq. libres %		
		Ca	Mg	K	S	T		Fe	Al	Si
0- 5	A ₀	1,30	0,45	0,58	2,33	19,1	12,0	1,5	4,0	0,5
5- 15	A ₁	0,18	0,09	0,13	0,40	5,0	8,0	1,4	0,6	0,4
15- 65	A ₂	0,12	0,03	0,04	0,19	2,6	7,3	1,6	0,4	0,4
65- 67	B _h	0,13	0,04	0,08	0,25	5,8	4,3	5,2	2,0	0,4
67- 90	B _s	0,13	0,04	0,08	0,25	7,6	3,3	10,4	5,0	0,8
90-105	B _s C	0,11	0,2	0,05	0,18	4,4	4,1	4,6	5,4	1,0
> 105	C	0,16	0,2	0,04	0,22	1,0	22,0	3,6	1,2	0,6

c.- Fétuque

La Fétuque utilisée provient de la station du Haut-Jacques.

Localisation : E = 6°51'00" - N = 48°16'9".

Topographie : Haut de pente (dôme). Exposition Nord. Altitude = 600 m.

Climat : P = 1 200 mm ; T = 8°.

Roche-mère : Grès intermédiaire homogénéisé sur conglomérat.

Végétation : Sapinière à Hêtre avec strate herbacée de Fétuque presque exclusive.

Description : SOL BRUN ACIDE

- A₀₀ (-5-0 cm) : Horizon au contact des racines de Fétuques, brun rouge sombre (2,5 YR 3/2).
- A₁ (0-10 cm) : Horizon organique, brun rouge sombre (2,5 YR 3/3). Quelques gros cailloux très poreux. Quartz blanchi. Polyèdres arrondis, irréguliers.
- A₁B (10-30 cm) : Brun rougeâtre (2,5 YR 4/4). Peu de cailloux. Petits polyèdres. Léger tassement.
- (B) (30-70 cm) : Brun rouge (10 YR 4/4). Quelques gros cailloux. Assez nombreuses racines. Gros polyèdres structuraux.
- C (70-110 cm) : Violacé (10 YR 4/3). Structure polyédrique irrégulière avec quelques enrobements. Quelques racines mortes.

Caractères physicochimiques.

Prof.	Hor.	Granulométrie %						C %	N %	C/N	pH
		S.G.	S.F.	L.G.	L	A	M.O.				
5- 0	A ₀₀							7,60	0,369	20,0	3,8
0- 10	A ₁	56,5	16,0	3,3	6,3	9,8	3,6	1,80	0,085	21,0	3,7
10- 30	A ₁ B	53,4	18,3	3,7	6,2	11,4	0,9	0,43	0,039	11,0	3,9
30- 70	(B)	51,2	19,6	3,3	6,4	12,3	0,4	0,19	0,033	5,7	4,0
70-110	C	56,4	14,0	2,4	4,3	15,6	0,3	0,13	0,019	6,8	3,8

Prof.	Hor.	Bases échangeables m.e./100g					100 $\frac{S}{T}$	Sesq. libres %		
		Ca	Mg	K	S	T		Fe	Al	Si
5- 0	A ₀₀	1,5	0,27	0,35	2,12	5,0	42,4	6,5	1,1	1,5
0- 10	A ₁	0,35	0,10	0,13	0,58	5,6	10,4	8,0	1,7	1,2
10- 30	A ₁ B	0,31	0,08	0,13	0,52	4,9	10,6	8,0	2,0	1,0
30- 70	(B)	0,28	0,05	0,13	0,46	4,0	11,5	9,0	2,2	0,7
70-110	C	0,26	0,05	0,13	0,44	4,5	9,8	9,2	2,0	1,5

2.- Extraction et conservation des hydrosolubles

a.- Extraction

De nombreuses études ont été faites, comparant les produits extraits des litières en fonction de la période de l'année, ou des conditions physiques présidant à l'extraction : température, humidité (NIKVIST, 1962 ; VEDY et BRUCKERT, 1970 ; HAYES, 1965).

Nous avons prélevé les végétaux au moment où se forme la litière fraîche, lors de la chute des feuilles, période à laquelle les extraits sont les plus riches (TOUTAIN, 1972). A cette époque, les produits phénoliques contenus dans la feuille senescente montrent une tendance à la polymérisation, et la proportion de polysaccharides décroît (DORMAAR, 1970). Par ailleurs, on observe également une hausse sensible des teneurs en azote (AUSSENAC et al., 1972).

Les hydrosolubles ont été extraits par macération des feuilles ou résidus végétaux non broyés dans de l'eau distillée, pendant 16 h et à la température du laboratoire. Les végétaux sont plongés dans l'eau à raison de 100 grammes par litre. Les hydrosolubles sont ensuite récupérés par filtration. 1/5 de l'eau est gardée pour rincer les végétaux avant d'être mélangée au reste.

b.- Conservation

Dans un premier temps, nous conservions les végétaux, extrayant les hydrosolubles au fur et à mesure des besoins. Mais nous avons constaté une évolution des produits extraits. Variation quantitative (tableau 1), mais aussi qualitative (figure 2). En effet, par filtration sur gel Séphadex, nous observons une augmentation de l'encombrement moléculaire des produits, surtout dans le cas des hydrosolubles de Callune.

Tableau 1.- Variation du carbone extrait en fonction du vieillissement des feuilles.

Date	Carbone extrait (mg/ml)	
	Novembre 72	Avril 73
Callune	1,67	2,15
Hêtre +	2,32	2,30
Hêtre B	2,15	1,70

Il s'avérerait donc nécessaire d'extraire en une seule fois les hydrosolubles et de les conserver en bloquant autant que possible toute évolution ultérieure. Pour cela, deux techniques étaient utilisables : la lyophilisation ou la congélation. La lyophilisation risquait d'altérer la microflore des hydrosolubles, dont nous avons besoin, nous ne l'avons donc pas retenue. Par contre, la congélation à -15°C était satisfaisante sur les plans biochimique et microbiologique (les hivers vosgiens font endurer à la microflore des températures plus rigoureuses que celle-là) ; c'est donc par congélation que nous avons conservé les hydrosolubles.

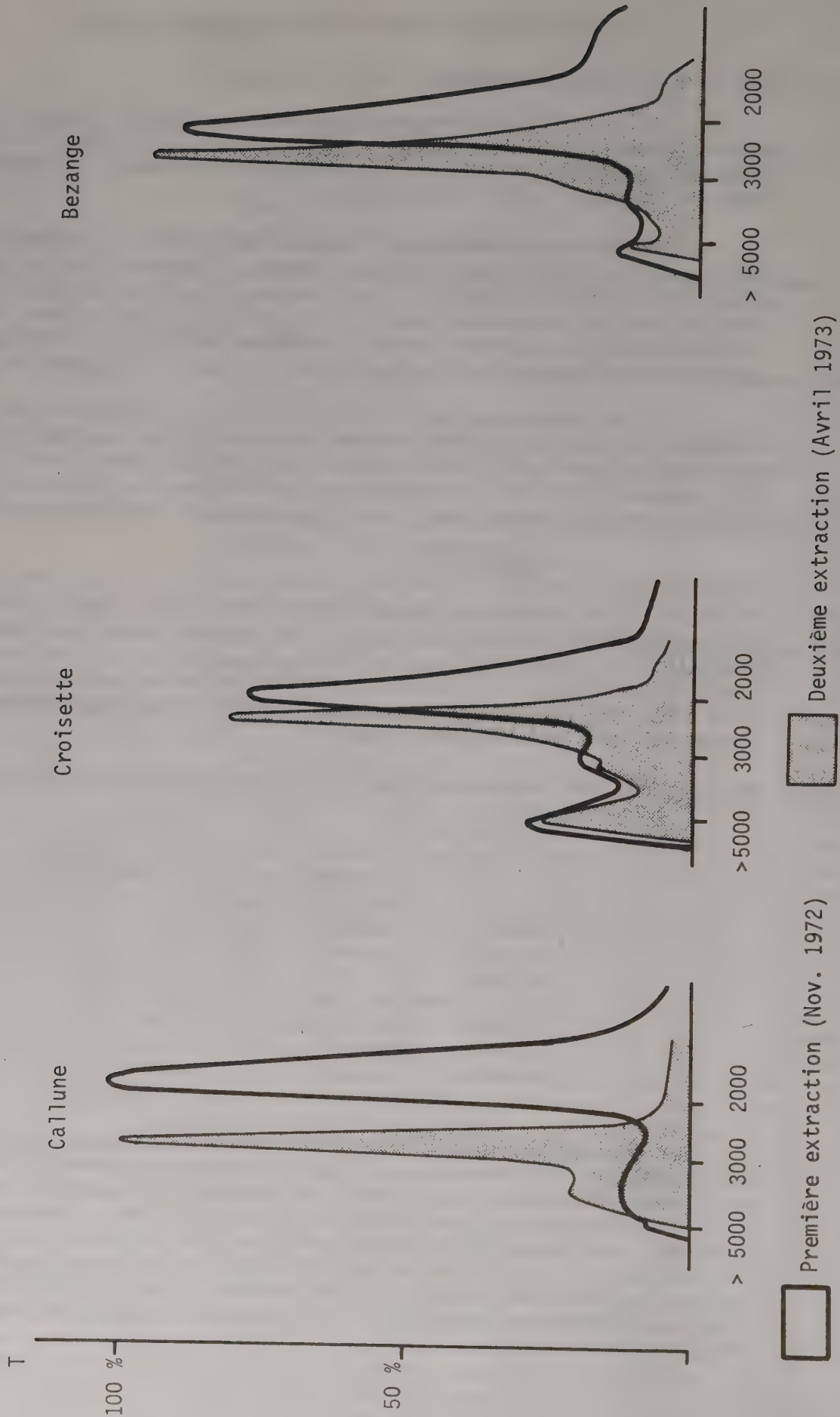


Figure 2.- Evolution du poids moléculaire des hydrosolubles extraits.

c.- Discussion

Quelle est la signification des hydrosolubles extraits dans ces conditions ?

Il est important de noter que, pour une station donnée, les hydrosolubles obtenus vont dépendre des caractéristiques climatiques de l'année et surtout de la période précédant le prélèvement des feuilles. D'une année à l'autre, selon que la saison était humide ou sèche, les quantités extraites peuvent varier de 1 à 10. Il faut donc donner plus d'importance aux valeurs relatives, permettant de comparer les hydrosolubles obtenus dans des conditions équivalentes, qu'aux résultats absolus des mesures effectuées.

II.- METHODES D'ETUDE

1.- Chromatographie sur gel

La chromatographie sur gel Séphadex est maintenant largement utilisée pour isoler des polymères d'encombrement moléculaire défini, et pour estimer les volumes moléculaires d'acides humiques et fulviques (DUBIN et al., 1968 ; JACQUIN et al., 1971). Lors du passage sur un gel, les produits chromatographiés se séparent généralement en deux fractions principales : la première dite "exclue" sort rapidement de la colonne et correspond à des produits de volume moléculaire supérieur aux pores du gel ; la seconde, dite "retenue", renferme des substances de volume moléculaire inférieur ou égal à la limite d'exclusion du gel utilisé. Les différentes fractions sont décelées à leur sortie de la colonne de chromatographie par passage à travers un détecteur optique à U.V. (280 mμ).

Les hydrosolubles sont filtrés sur une colonne de gel G 25 et l'importance de chaque fraction est estimée par la surface correspondante de l'enregistrement. Le poids moléculaire équivalant à chaque pic, est déterminé à l'aide d'un abaque (Figure 3).

2.- Absorption en lumières visible et ultraviolette

L'étude des densités optiques à différentes longueurs d'ondes a permis depuis longtemps de caractériser les substances humiques (JACQUIN, 1963 ; KONONOVA, 1966). Les données obtenues sont utilisables pour suivre un système d'évolution ou de condensation, mais il est hasardeux de les employer pour comparer des produits d'origines différentes.

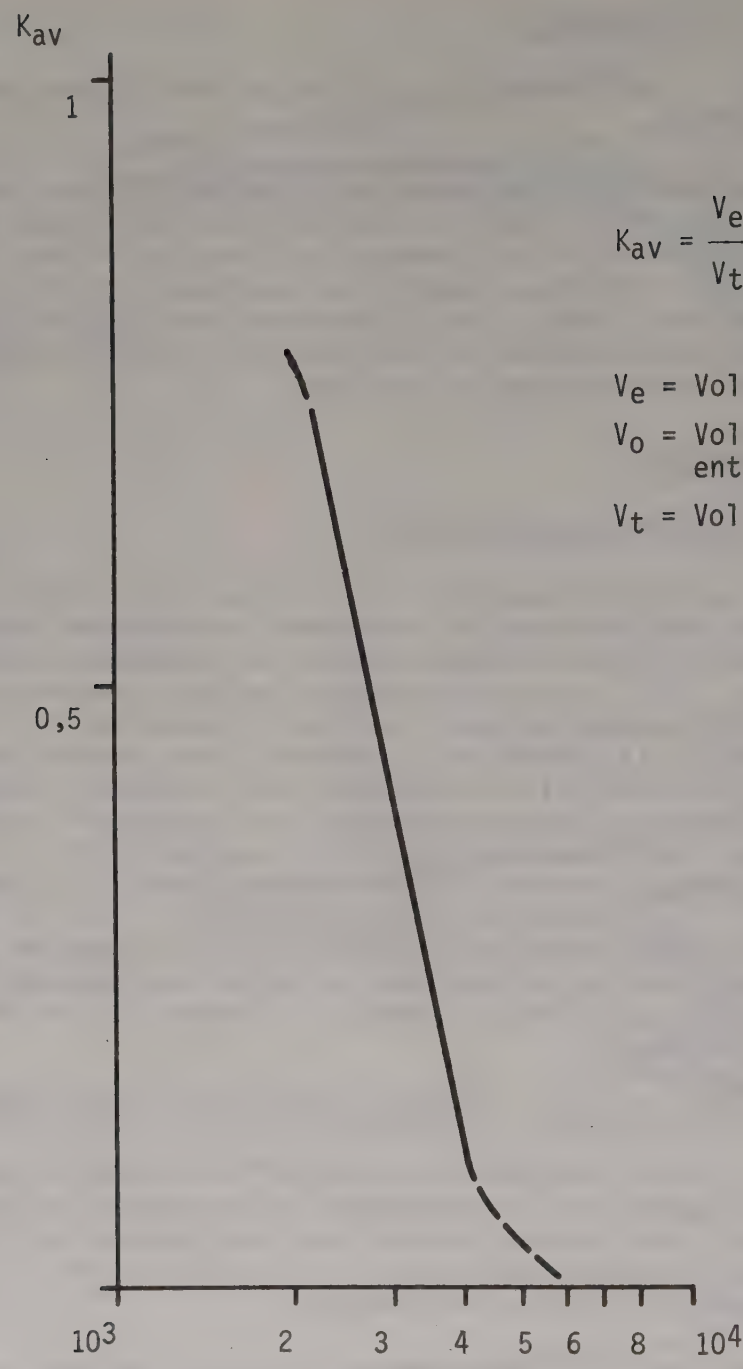
Après avoir été ramenées par dilution à un même taux de carbone, les solutions sont placées dans des cuves calibrées de quartz et leur absorption est mesurée à différentes longueurs d'ondes : 280 - 470 - 665 mμ, à l'aide d'un spectrophotomètre Jean et Constant.

3.- Hydrolyses acides

Pour attaquer les polymères contenus dans les hydrosolubles, et libérer ainsi une partie des produits simples qu'ils contiennent, nous avons procédé à des hydrolyses.

a.- Hydrolyse acide : HCl 6N

Les hydrosolubles sont hydrolysés à reflux pendant 16 heures après adjonction volume à volume d'HCl concentré. Ce traitement libère les aminoacides engagés dans des combinaisons peptidiques.



$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e = Volume d'élution du polymère
 V_o = Volume des vides existant entre les grains de gel
 V_t = Volume total de la colonne

Figure 3.- Abaque pour la détermination du poids moléculaire correspondant à un gel séphadex G25.

b.- Hydrolyse oxydante

Dans certains cas, pour aller plus loin dans la destruction d'édifices polymérisés, nous avons fait une deuxième hydrolyse sur le résidu de la précédente, à l'aide d'HCl 6N contenant 3 % de H₂O₂. Il est ainsi possible d'atteindre notamment des amino-acides liés directement à des cycles aromatiques (PIPER et POSNER, 1972).

4.- Analyses biochimiques

Deux groupes de produits ont retenu notre attention ; ce sont les acides aminés et les composés phénoliques.

a.- Acides aminés

- Extraction : Les acides aminés en solution sont isolés par passage sur une résine cationique (Amberlite IR 1 200) à laquelle ils sont fixés par leur groupement aminé. Après lavage de la résine à l'eau distillé, les acides retenus sont élués par une solution de NH₄OH 2N. L'ammoniaque est ensuite éliminée par évaporation à sec sous pression réduite. Les acides aminés sont alors repris par 1 ml d'eau distillée pour chromatographie.

Nous distinguerons par la suite, les "acides aminés libres", obtenus sur un hydrosoluble non traité, et les "acides aminés totaux", obtenus à partir d'un hydrosoluble hydrolysé. Les seconds comprennent donc les acides aminés libres plus les acides aminés libérés par la rupture des liaisons peptidiques.

- Chromatographie : Des chromatographies bi-dimensionnelles permettent une étude qualitative et une estimation semi-quantitative des acides ainsi extraits.

Support : Papier Whatmann 3 MM

Solvants : 1ère dimension (ascendante - 15 à 17 h)

Butanol II 7 volumes

Acide formique 1 volume

Eau 2 volumes

2ème dimension (descendante - 22 à 23 h)

Ethyl-méthyl-cétone 70 volumes

Pyridine 15 volumes

Eau 15 volumes

Révélation : Pulvérisation rapide du révélateur

50 mg de ninhydrine

30 mg d'éthanol

1,45 ml de triméthylpyridine

1,10 ml d'acide acétique

La couleur des taches apparaît après passage pendant 5 minutes dans une étuve à 105°C.

- Dosage global : Globalement, il est possible de doser les amino-acides par un réactif à la ninhydrine (MOORE et STEIN, 1964).

Les hydrosolubles sont dosés tels quels, les hydrolysats doivent être débarrassés de leur acide chlorhydrique par assèchements répétés sous pression réduite, et repris par de l'eau distillée.

Préparation du réactif : 400 mg de ninhydrine et 60 mg d'hydrindantine sont dissous dans 15 ml de méthylcellosolve. On ajoute alors 5 ml de tampon pH 4,5 (544 g d'acétate de sodium sont dissous dans 400 ml d'eau distillée ; après refroidissement à la température ambiante, on ajoute 100 ml d'acide acétique glacial et on complète à 100 ml). Ce réactif doit être utilisé dans la journée, pour éviter une oxydation de l'hydrindantine ; il faut néanmoins le conserver à l'abri de la lumière.

Dosage colorimétrique : 1 ml de la solution à analyser est mélangé dans un tube à essai à 1 ml de réactif à la ninhydrine et aussitôt placé dans un bain-marie en ébullition pendant exactement 15 minutes. La coloration est alors maximum. Le milieu réactionnel est ensuite ajusté à 15 ml avec de l'éthanol à 50 % puis fortement agité pour oxyder l'excès d'hydrindantine. L'intensité de la coloration est mesurée au photomètre à 570 mμ. La concentration d'acides exprimée en "équivalent-Leucine" est déterminée à l'aide d'une courbe étalon établie à partir de la Leucine.

b.- Produits phénoliques

- Extraction : Les produits phénoliques sont extraits à l'acétate d'éthyle (BRUCKERT, 1970) après ajustement du pH à 1. L'extraction est répétée trois fois, l'ensemble de la fraction phénolique extractible est ainsi dans la phase organique. Après évaporation à sec, le résidu est repris avec du bicarbonate de soude (à 5 %) qui a pour effet supplémentaire de salifier les fonctions acides présentes. Les acides phénols ne sont donc plus solubles lors de l'extraction suivante qui ne concernera que les phénols non acides ; cette extraction est répétée également trois fois. La phase aqueuse contenant les acides phénols est à ce moment acidifiée à pH 1 de façon à permettre à nouveau leur extraction. Ils sont extraits à leur tour par l'acétate d'éthyle.

- Chromatographie : Deux techniques chromatographiques ont été confrontées : la chromatographie sur papier et la chromatographie en phase gazeuse.

Support : Papier Whatmann n° 1

Solvants : 1ère dimension (ascendante - 3 à 4 h)

Acide acétique 6 %

2ème dimension (ascendante - 6 à 7 h)

Benzène 6 volumes

Acide acétique ... 7 volumes

Eau 3 volumes

Révélation : 1) Observation sous lumière U.V.

2) Observation sous lumière U.V. avec vapeur de NH₃

3) Pulvérisation du premier révélateur :

P. nitraniline à 0,5 % dans HCl 2N ... 5,0 ml

Nitrite de Na à 5 % 0,5 ml

Acétate de Na à 20 % 15 ml

4) Après avoir noté la couleur des taches, pulvériser du carbonate de Na (15 %).

Phase gazeuse : Les produits extraits sont préalablement silylés par le B.S.A. (Bis(triméthyl)-silylacétamide). La chromatographie est menée sur un appareil Hewlett-Packard 5 750 G en programmation de température entre 80° et 280°C, à raison de 4°C/mn. La phase stationnaire de la colonne (HP. W 982 ; 3,2 mm de diamètre ; 1,83 m de longueur) est constituée par 10 % de silicone Gum Rubber U.C.C. (méthyl-vinyl) fixée sur terre d'infusoire de 80-100 mesh. Les phénols et acides phénols sont déterminés dans la mesure du possible, à l'aide de témoins passés dans les mêmes conditions (NGUYEN QUAT HAO, 1974). Une estimation semi-quantitative des produits est faite par mesure de la hauteur des pics enregistrés à leur sortie.

5.- Incubations

Les incubations se sont déroulées dans le dispositif maintenant classique représenté à la figure 4.

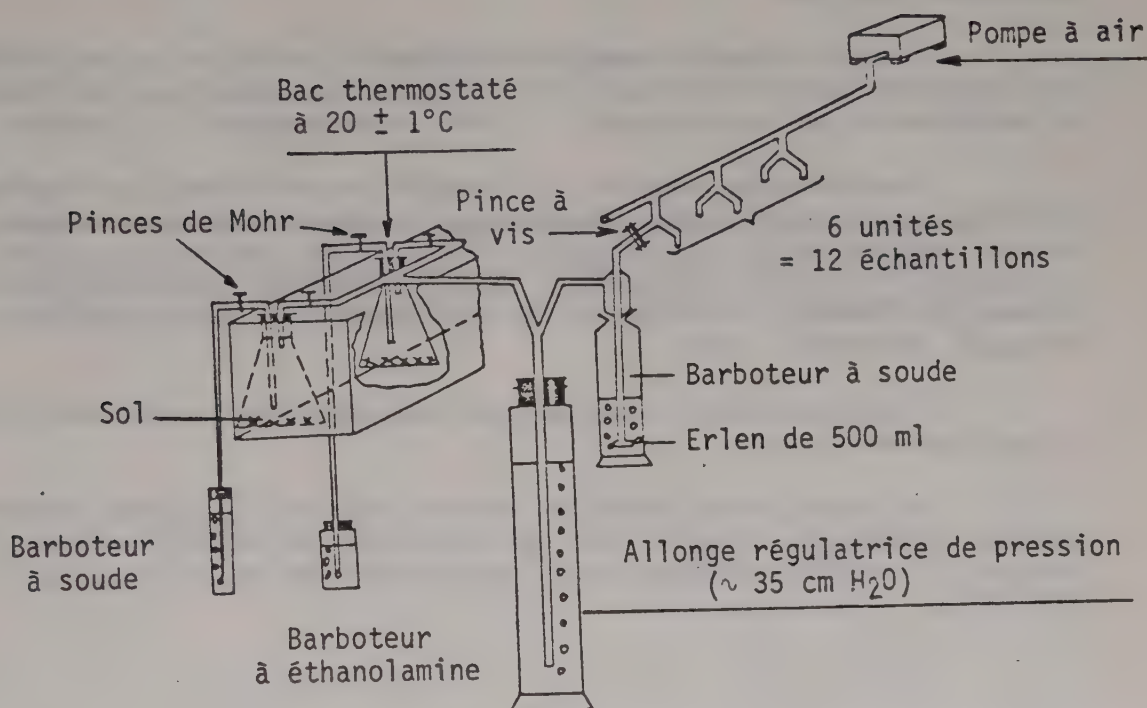


Figure 4.- Schéma du dispositif d'incubation (D'après GUCKERT et al., 1968)

Les produits à incuber - hydrosolubles ou sols humidifiés à la capacité au champ - sont placés dans des erlenmeyers plongés dans un bain-marie thermostaté à 28°C. Chaque jour, le CO₂ dégagé est balayé par un courant d'air (débarrassé au préalable de CO₂ par barbotage dans la soude) et piégé soit par de la soude, soit par de l'éthanolamine s'il faut effectuer un comptage de radioactivité. Le dosage dans la soude est fait par titrimétrie avec HCl, après avoir précipité le carbonate par BaCl₂. Il est ainsi possible de suivre quotidiennement l'activité minéralisatrice de la microflore mise à incuber.

6.- Comptages de radioactivité

La radioactivité présente dans les différents échantillons, a été mesurée par scintillation liquide avec le compteur Tricarb 574 de Packard. Deux scintillateurs sont utilisés pour convertir en lumière visible les émissions radioactives : l'Instagel de Packard pour les solutions aqueuses ou une solution de P.P.O. (5 g) + P.O.P.O.P (300 mg) dans un litre de toluène, dans le cas particulier de l'éthanolamine ayant fixé le CO₂ dégagé lors de l'incubation.

Les valeurs enregistrées sont ensuite converties en désintégrations par minute (d.p.m.) grâce à des tables de correction.

7.- Extraction

Après incubation des hydrosolubles en présence d'un substrat minéral, les produits humiques solubles sont extraits par agitation en présence de plusieurs réactifs.

Dans un premier temps, extraction des produits encore hydrosolubles par agitation pendant une heure en présence d'eau distillée. La fraction liquide est séparée par centrifugation (3 500 tr/mn pendant 1/4 d'heure).

Les alcalino-solubles sont ensuite extraits par deux agitations successives du sol en présence d'un mélange de pyrophosphate de sodium et d'hydroxyde de sodium (NaOH 0,1 N - Na₄P₂O₇ 1 % - pH 13). Au cours de cette extraction, le calcium, le fer et l'aluminium complexés seraient remplacés par le sodium, formant des humates de sodium et des pyrophosphates insolubles avec les cations échangés (KONONOVA, 1966).

L'extraction est terminée par une agitation en présence d'hydroxyde de sodium (NaOH 0,1 N).

Au cours des différentes extractions, les colloïdes minéraux sont mis en suspension, et une simple centrifugation ne suffit pas à les faire précipiter. Il est donc nécessaire de les flocculer par adjonction d'un électrolyte (KCl 1 %).

DEUXIEME PARTIE

COMPOSITION DES HYDROSOLUBLES EXTRAITS DES DEUX LITIERES

COMPOSITION DES HYDROSOLUBLES
EXTRAITS DES DEUX LITIERES

Dans l'étude de la composition des hydrosolubles de Hêtre et de Callune, outre les déterminations globales (C, N, pH ...), nous nous sommes surtout attachés à deux catégories de composés : les produits phénoliques (avec distinction des acides phénoliques des autres composés) et les acides aminés. Il est certain que ces fractions ne constituent pas l'ensemble des composés organiques hydrosolubles puisqu'ils ne représentent que 30 à 40 % du carbone total extrait. Les hydrates de carbone (GALLALI, 1972) et les acides aliphatiques (BRUCKERT et JACQUIN, 1969) ne sont pas négligeables. Cependant, les composés phénoliques et aminés sont importants par leur rôle particulier, et selon leur abondance respective, selon leur état (molécules libres ou incluses dans des édifices plus polymérisés), selon leur possibilité de réagir entre eux, l'effet "tannant" sera plus ou moins marqué, et l'humification pourra être favorisée ou non.

I.- COMPOSITION ELEMENTAIRE

1.- Carbone - Azote

Tableau 2.- Carbone et azote hydrosolubles

	C ppm de végétal sec à 105°C	C mg/ml	N mg/ml	C/N
Callune	2 332	2,15	0,0252	85,3
Hêtre C	2 473	2,30	0,1043	22,0
Hêtre B	1 828	1,70	0,0504	33,7

Les quantités de carbone hydrosoluble sont peu différentes dans les trois cas, alors que l'azote est beaucoup plus variable : l'hydrosoluble de Callune contient peu d'azote (25 ppm) alors que celui du Hêtre de La Croixette (Hêtre C) en contient 4 fois plus.

Les valeurs du C/N permettent de faire une première comparaison qualitative des hydrosolubles. Malgré des teneurs en carbone et azote sensiblement différentes, les deux hydrosolubles de Hêtre ont des C/N voisins et relativement bas, montrant des produits assez riches en azote. Les différences observées précédemment seraient donc dues à une variation plus quantitative que qualitative des composés solubilisés. Pour la Callune, par contre, le C/N nettement plus élevé est le signe d'une composition différente, de produits relativement peu azotés.

2.- Cations

Tableau 3.- Principaux cations présents dans les hydrosolubles (exprimés en $\gamma/\text{mg C}$)

	K	Ca	Mg	Mn	Fe	Al	Cu
Callune	127	12	8,2	1,1	0,4	0,2	0,030
Hêtre C	129	11	2,6	1,0	0,4	0,1	0,043
Hêtre B	140	24	8,8	10,0	0,5	0,2	0,023

Nous voyons ici que l'influence de la roche-mère s'ajoute nettement à celle de l'essence végétale. En effet, la Callune et le Hêtre C proviennent de stations situées sur grès vosgien, et le Hêtre de Bezange (Hêtre B) se trouve sur du grès rhétien (Tableau 4).

Tableau 4.- Analyse totale des roches-mères en %. (d'après VEDY, 1973)

	K	Ca	Mg	Mn
Grès vosgien	1,4	0,07 à 0,30	0,80	0,08
Grès rhétien	7,0	0,12	0,95	0,30

Le manganèse peu abondant dans le grès vosgien, l'est également dans les hydrosolubles de Callune et de Hêtre C. Les hydrosolubles du Hêtre B sont par contre beaucoup plus riches en ce cation, comme le grès rhétien. Pour le potassium cependant, nous ne retrouvons pas au niveau des hydrosolubles, la différence des deux roches-mères.

Nous pouvons donc dire que, sans être systématique, l'influence de la roche-mère sur les cations contenus dans les hydrosolubles est sensible. Les cations ayant une influence sur les synthèses biologiques et sur l'évolution des hydrosolubles, l'action de la roche-mère pourra se faire sentir malgré la similitude de végétation.

3.- pH et acidité titrable

Tableau 5.- pH et acidité des hydrosolubles

	pH	Acidité m.e./mgC
Callune	4,2	$5,9 \cdot 10^{-3}$
Hêtre C	4,7	$7,2 \cdot 10^{-3}$
Hêtre B	4,9	$8,7 \cdot 10^{-3}$

Les pH obtenus sont donc acides, et sensiblement plus pour la Callune que pour les deux échantillons de Hêtre, une fois encore assez proches l'un de l'autre. Mais paradoxalement, le pH croît avec l'acidité titrable.

Cette contradiction apparente est vraisemblablement due au fait qu'un certain nombre de fonctions acides des hydrosolubles sont à l'état naturel sous forme salifiée : en effet, l'acidité est dosée après décationisation. Il y aurait donc relativement moins de fonctions acides libres chez le Hêtre que chez la Callune ; une sorte "d'effet tampon" plus accentué chez le Hêtre.

Cet effet semble avoir deux origines : l'une végétale, nous le voyons en comparant la Callune et le Hêtre C ; l'autre minérale. Ainsi, la différence entre pH et acidité est plus sensible pour le Hêtre B que pour le Hêtre C, situé sur la roche-mère la moins riche en cations utilisables par les végétaux.

II.- ENCOMBREMENT MOLECULAIRE DES COMPOSES HYDROSOLUBLES

L'encombrement des molécules contenues dans les hydrosolubles est mesuré par filtration sur gel Séphadex G 25. La répartition du carbone dans les différentes fractions est calculée d'après la surface des pics enregistrés, et les comparaisons quantitatives entre les trois hydrosolubles sont possibles si l'on ramène tous les résultats à une même quantité de carbone déposé (1 mg). Les enregistrements obtenus montrent dans chaque cas un pic important dans la fraction retenue pour les analyses ; nous avons établi une coupure avant ce pic correspondant à un encombrement moléculaire d'environ 2 800 (tableau 6).

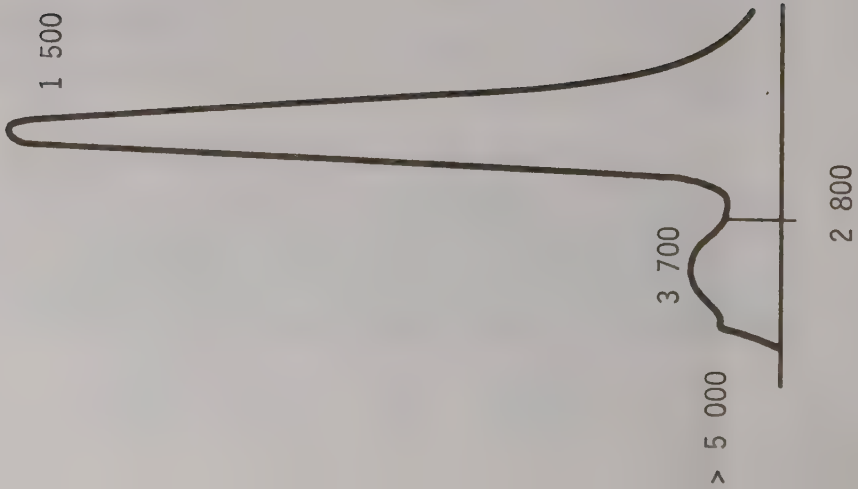
Tableau 6.- Répartition des composés hydrosolubles en fonction de leur encombrement moléculaire.

	PM > 2 800		PM < 2 800		Total surface	PM du pic principal
	Surface	%	Surface	%		
Callune	356	15	1 988	85	2 344	1 500
Hêtre C	523	33	1 080	67	1 603	2 100
Hêtre B	348	18	1 572	82	1 920	2 100

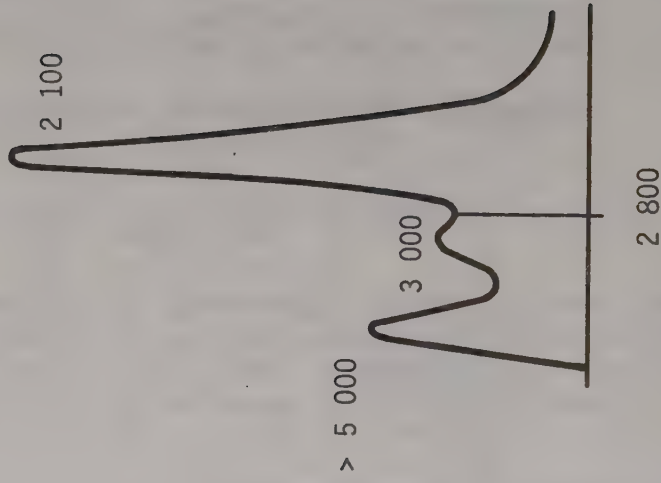
Il apparaît donc que les hydrosolubles sont composés principalement de petites molécules, plus encore dans le cas de la Callune (dont le pic principal correspond à un encombrement moléculaire de 1 500) que dans celui du Hêtre (2 100). Par ailleurs, la fraction exclue (encombrement supérieur à 5 000) est pratiquement inexistante pour la Callune, alors qu'elle est nette chez les deux hydrosolubles de Hêtre (Figure 5).

Cependant, si les deux hydrosolubles de Hêtre donnent encore des résultats identiques sur le plan qualitatif (nous y retrouvons les mêmes pics), ils présentent des variations quantitatives d'une fraction à l'autre. Dans l'ensemble, les produits du Hêtre C sont plus encombrants : 33 % du carbone contre 18 se retrouvent dans la partie supérieure à 2 800. En outre, la fraction exclue est relativement plus importante dans le cas du Hêtre C.

Callune (0,50 mgC)



Hêtre C (0,70 mgC)



Hêtre B (0,65 mgC)

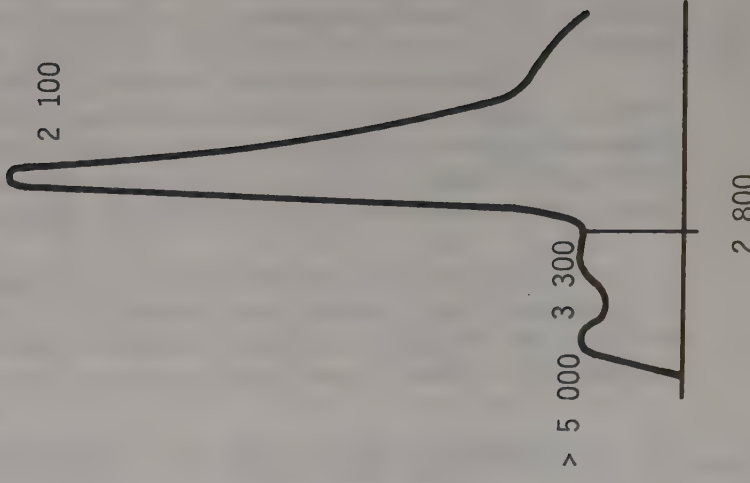


Figure 5.- Filtration des hydrosolubles sur gel séphadex G25

III.- CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES PRINCIPAUX COMPOSES HYDROSOLUBLES

1.- Etude générale : densité optique

La filtration sur gel Séphadex nous a permis de déterminer l'encombrement des diverses catégories de "molécules" contenues dans les hydrosolubles, l'analyse de leur densité optique en visible et ultraviolet nous donne une idée de la structure des édifices moléculaires.

En effet, la densité optique à 280 mμ augmente avec la quantité de cycles aromatiques présents dans la solution analysée. Par ailleurs, la densité optique en lumière visible croît avec la condensation des cycles aromatiques.

Tableau 7.- Densités optiques des hydrosolubles pour une concentration de 1 mg C/ml.

	280	472	665	Q 4/6
Callune	11,4	0,090	0,014	6,43
Hêtre C	7,3	0,174	0,017	10,21
Hêtre B	7,2	0,137	0,021	6,52

L'hydrosoluble de Callune absorbe plus en UV que ceux de Hêtre ; par contre le phénomène est inverse pour les radiations visibles. Il apparaît donc que les hydrosolubles de Hêtre contiennent moins de cycles aromatiques que ceux de la Callune, mais qu'ils y sont plus condensés. Les deux hydrosolubles de Hêtre ont une densité voisine pour l'UV, donc ils contiennent sensiblement la même quantité de cycles, mais avec un degré de condensation différent. La corrélation entre l'absorption à 472 mμ et les analyses de filtration sur gel semble montrer une condensation plus importante dans le cas du Hêtre C.

Par contre, l'interprétation du rapport Q 4/6 (JACQUIN, 1963) est ici plus délicate. En effet, ce rapport décroît en principe si la condensation des produits augmente, ce qui est en contradiction avec ce que nous observons ici, puisque le Hêtre C qui est le plus condensé, présente le Q 4/6 le plus élevé. Le rapport serait dans ce cas utilisable pour suivre la condensation d'une solution donnée plus que pour comparer le degré de condensation de plusieurs solutions différentes.

2.- Composition phénolique

Les analyses de densité optiques en UV permettent d'appréhender de façon globale les cycles aromatiques présents dans les hydrosolubles, que ces cycles soient isolés ou regroupés en unités de tailles variables. Les produits phénoliques extraits par l'acétate d'éthyle sont simples et ne contiennent que 1, 2 ou au maximum 3 cycles.

Le dosage du carbone correspondant à la fraction extraite est possible après évaporation de l'acétate d'éthyle (dont le résidu est inférieur à 3 % du carbone mesuré). Nous constatons une similitude entre les trois hydrosolubles analysés puisque ce carbone extractible à l'acétate d'éthyle représente environ 25 % du carbone total hydrosoluble.

a.- Acides phénols

Tableau 8.- Acides phénols de l'hydrosoluble de Callune.

t °C	Nom	H/mm	t °C	Nom	H/mm
126	Salicylique 1	50	191	Protocatéchique ..	80
132		-	197	Syringique	-
156	Salicylique 2	15	202	p.coumarique	20
170	p.hydroxybenzoïque ..	30	216	Férulique	-
184	Vanillique	20	220	Caféique	180
186	Gentisique	25	295	Chlorogénique	260

La quantité de chaque acide est indiquée par la hauteur (H) exprimée en mm du pic enregistré à la sortie du chromatographe en phase gazeuse. Ce n'est pas là une unité de poids mais, nous l'avons dit, étant donné la grande variation de concentration des hydrosolubles en fonction des années, nous ne donnons une réelle importance qu'à des valeurs relatives.

La hauteur du pic enregistré est un moyen de comparaison très suffisant lorsqu'il s'agit de comparer les teneurs en un composé donné dans les trois hydrosolubles. Il convient d'être plus prudent pour comparer les quantités respectives des divers acides phénols dans un hydrosoluble car, à dose égale différents produits ne donnent pas obligatoirement des pics d'importance équivalente (TRANCHANT, 1968). Cependant, sans être très précis, ces résultats peuvent être analysés dans ce sens (tableau 8) ; malgré tout, nous avons comparé les hydrosolubles en prenant comme référence sur chaque acide, la quantité présente dans l'hydrosoluble de Callune, ou à défaut, dans celui du Hêtre C (Tableau 9).

Tableau 9.- Comparaison semi-quantitative des acides phénols présents dans les hydrosolubles.

t °C	Nom	Callune	Hêtre C	Hêtre B
126	Salicylique 1	100	30	30
132		-	100	90
156	Salicylique 2	100	500	400
170	p.hydroxybenzoïque	100	260	250
184	Vanillique	100	170	170
186	Gentisique	100	80	60
191	Protocatéchique	100	50	70
197	Syringique	-	100	100
202	p.coumarique	100	120	200
216	Férulique	-	100	100
220	Caféique	100	20	60
295	Chlorogénique	100	-	-

Nous pouvons noter une grande similitude dans la composition des deux hydrosolubles de Hêtre. En comparant Hêtre et Callune, nous trouvons chez celle-ci plus d'acides comportant deux groupements hydroxyles en position ortho ou méta (gentisique, protocatéchique, caféique ou chlorogénique) mais moins d'acides méthoxylés (vanillique, syringique et férulique) ou n'ayant qu'un seul hydroxyle (salicylique, p.hydroxybenzoïque et p.coumarique).

En outre, chez la Callune, le chlorogénique et le caféique sont très abondants ; le protocatéchique est important également ; alors que chez le Hêtre, ce sont surtout le p.hydroxybenzoïque et le salicylique (m.hydroxybenzoïque) qui dominent mais avec des teneurs plus faibles.

Lorsqu'on fait subir une hydrolyse acide (HCl 6N) aux hydrosolubles, les édifices moléculaires sont partiellement détruits, notamment par suite de la rupture des liaisons peptidiques, et certains composants de ces ensembles sont libérés à l'état de produits plus simples.

Ainsi, l'hydrolyse acide provoque l'apparition en quantité importante de deux acides aliphatiques : l'acide oxalique et l'acide succinique (Tableau 10)

Tableau 10.- Hauteur des pics en mm correspondant aux acides aliphatiques libérés par hydrolyse.

t °C	Nom	Callune	Hêtre C	Hêtre B
110	Acide oxalique	810	770	810
136	Acide succinique	40	590	210

L'acide oxalique apparaît de façon équivalente dans les trois cas, mais l'acide succinique est beaucoup plus abondant chez le Hêtre que chez la Callune, et plus encore d'ailleurs dans l'hydrosoluble du Hêtre C que dans celui du Hêtre B.

Ces acides viennent d'une part de la rupture de petites molécules comportant une chaîne latérale avec une double liaison (acide férulique-caféique par exemple) et d'autre part de la destruction plus ou moins complète de chaînes aliphatiques présentes dans les composés hydrosolubles plus complexes ou de l'attaque des carbohydrates.

En ce qui concerne les acides phénols, nous observons, selon les cas, une diminution ou une augmentation (tableau 11).

Les acides phénols qui disparaissent sont ceux qui contiennent une double liaison fragile dans une chaîne (férulique, caféique et chlorogénique). Les acides p-hydroxybenzoïque et protocatéchique sont beaucoup plus abondants après l'hydrolyse, dans tous les hydrosolubles : il s'en trouve de 4 à 10 fois plus. Cependant, nous retrouvons toujours la même différence entre les deux espèces végétales, à savoir que la Callune libère plus d'acide protocatéchique (dihydroxylé) alors que dans le cas du Hêtre, c'est l'acide p.hydroxybenzoïque (mono-hydroxylé) qui domine.

Il semblerait donc que ces deux acides phénols soient les plus abondants et les plus incorporés, au moins au niveau d'édifices facilement destructibles.

Tableau 11.- Acides phénols après hydrolyse acide (100 = Callune avant hydrolyse, sauf pour "132" et l'acide syringique où le Hêtre C sert de référence)

t °C	Nom	Callune	Hêtre C	Hêtre B
126	Salicylique 1	30	20	30
132		120	150	160
156	Salicylique 2	100	380	430
170	p-hydroxybenzoïque	500	2 660	1 660
184	Vanillique	230	330	380
186	Gentisique	240	120	140
191	Protocatéchique	450	240	300
197	Syringique	200	150	200
202	p-coumarique	150	70	120
216	Férulique	-	-	-
220	Caféique	-	-	-
295	Chlorogénique	-	-	-

D'une façon générale, ces "molécules", qu'elles soient déjà formées dans la feuille vivante ou qu'elles apparaissent lors d'une première évolution "interne" de celle-ci juste après sa chute, paraissent renfermer plus d'acides phénols dans le cas du Hêtre que dans celui de la Callune.

b.- Phénols

Tableau 12.- Principaux phénols hydrosolubles de la Callune

t °C	Nom	H	t °C	Nom	H
127		10	178		11
136	Pyrocatechol	15	186		55
146	Hydroquinone	130	189	1-4 dihydroxynaphtalène	70
150		500	195		10
164		30	202		80
172		5	205		40
			274	Catéchine	200

Les chromatogrammes permettent de déceler la présence de nombreux phénols simples, non identifiés pour la plupart, mais souvent en quantité limitée. Les plus importants sont reportés dans deux tableaux qui permettent d'apprécier l'abondance relative de ces produits (tableau 12) et surtout de comparer les trois hydrosolubles (tableau 13).

Tableau 13.- Comparaison des principaux phénols présents dans les hydrosolubles (même notation que pour les acides phénols).

t °C	Nom	Callune	Hêtre C	Hêtre B
127		100	50	100
136	Pyrocatéchol	100	30	30
146	Hydroquinone	100	-	-
150		100	-	-
164		100	-	-
172	Phloroglucinol	100	500	400
178		100	100	130
186		100	-	-
189	1-4 dihydroxynaphtalène	100	110	140
195		100	700	750
202		100	20	30
205		100	70	100
274	Catéchine	100	-	-
278			100	100
283			100	100

Là aussi, nous constatons une assez grande similitude entre les deux stations de Hêtre, mais beaucoup plus de différences qualitatives entre les deux espèces végétales.

Dans l'hydrosoluble de Callune, la "tache jaune", en chromatographie sur papier, produit non identifié sortant à 150°C en phase gazeuse, domine nettement tous les autres phénols. L'hydroquinone et la catéchine sont également importants (tableau 12). Ces composés majeurs chez la Callune, sont inexistants chez le Hêtre, du moins à l'état libre.

D'une façon générale, les phénols plus abondants dans le cas du Hêtre que dans celui de la Callune (phloroglucinol, "195", "278", "283") sont quantitativement peu importants. Il semble donc que les hydrosolubles de Callune contiennent sensiblement plus de phénols libres que ceux du Hêtre.

L'hydrolyse acide provoque la diminution de beaucoup de produits phénoliques, surtout dans l'hydrosoluble de Hêtre où seuls le "127", le pyrocatéchol et l'hydroquinone augmentent sensiblement (Tableau 14.).

Chez la Callune, par contre, si la "tache jaune" et la catéchine disparaissent totalement, l'hydroquinone et le pyrocatéchol augmentent de façon très nette, notamment ce dernier qui voit sa quantité multipliée par 10.

Tableau 14.- Evolution des phénols après hydrolyse (même notation que pour les acides phénols).

t °C	Nom	Callune	Hêtre C	Hêtre B
127		200	150	200
136	Pyrocatechol	1 000	70	130
146	Hydroquinone	154	20	120
150		-	-	-
164		30	-	-
172	Phloroglucinol	400	300	300
178		130	60	60
186		-	-	-
189	1-4 dihydroxynaphtalène	50	30	50
195		300	50	60
202		20	20	20
205		10	10	10
274	Catéchine	-	-	-
278		-	-	-
283		-	-	-

Comme dans le cas des acides phénols, nous retrouvons ici l'importance particulière dans les hydrosolubles de Callune des produits phénoliques dihydroxylés (pyrocatechol et hydroquinone). Par contre, si les acides phénols libérés par l'hydrolyse acide étaient plus abondants dans l'hydrosoluble de Hêtre, c'est, pour les phénols, avec la Callune que l'action de l'hydrolyse est la plus sensible.

3.- Acides aminés

La composition élémentaire des hydrosolubles a montré une variation importante des quantités d'azote présentes dans les solutions. L'analyse de la fraction aminée va nous permettre d'apprécier les différences qualitatives.

a.- Inventaire des amino-acides présents dans les hydrosolubles

Nous retrouvons donc les mêmes acides aminés dans le cas de la Callune et du Hêtre, exception faite de la proline, très abondante chez le Hêtre, quasiment inexistante chez la Callune.

L'hydrolyse n'apporte pas de changement sensible sur le plan qualitatif : aucun amino-acide ne semble jouer de rôle particulier lors de la polymérisation, à la différence de certains types de produits phénoliques, plus réactifs que d'autres.

Tableau 15.- Comparaison des acides aminés libres présents dans les hydrosolubles de Hêtre et de Callune.

Amino-acide	Callune	Hêtre
Leucine	ε	+
Iso Leucine	ε	+
Valine	+	++
Proline	-	+++
Alanine	++	++
Thrénine	+	+
Glycine	+	+
Asparagine	ε	+
Acide glutamique	++	+
Acide aspartique	+	+
Sérine	ε	ε
Phényl alanine	+	ε
Méthionine	+	+
Tryptophane	+	+
Thyrosine	ε	+

b.- Analyses quantitatives des amino-acides

Tableau 16.- Répartition de l'azote aminé dans les hydrosolubles

		Callune	Hêtre C	Hêtre B
Amino-acides libres	γ/ml	9,6	48,0	30,2
	γ/mg C hydro	4,5	20,9	17,8
	% N hydro	38,0	47,0	60,0
Amino-acides totaux	γ/ml	25,2	79,2	45,9
	γ/mg C hydro	11,7	34,4	27,0
	% N hydro	100,0	75,6	91,1
<u>Amino-Acides totaux</u>		2,62	1,65	1,52
Amino-Acides libres				

L'analyse des quantités absolues d'acides aminés libres et totaux présents dans les hydrosolubles ne permet pas de comparer correctement ceux-ci ; il est nécessaire pour cela, soit de faire référence au carbone présent pour tenir compte des différences de concentration de matière sèche dans les extraits, soit de se référer à l'azote total hydrosoluble, pour une approche plus précise de la fraction azotée (Tableau 16).

Que ce soit en quantité absolue ou en faisant référence au carbone, les hydrosolubles de Hêtre contiennent de 3 à 5 fois plus d'acides aminés libres que ceux de la Callune. En comparaison de l'azote total hydrosoluble, bien que les écarts soient plus faibles, la Callune reste toujours nettement au dessous des valeurs obtenues pour les deux stations de Hêtre.

L'hydrolyse acide, en détruisant les liaisons peptidiques, libère des acides aminés précédemment soustraits à notre observation. Les acides ainsi libérés sont proportionnellement nettement plus abondants dans l'hydrosoluble de Callune, bien que les quantités absolues mises en jeu y soient plus faibles. Ainsi, dans les composés extraits à partir de la Callune, on trouve 1 atome d'azote aminé libre pour 2,6 atomes d'azote aminés totaux, contre 1 pour 1,6 dans le cas des hydrosolubles de Hêtre.

Ces résultats montrent que la participation des acides aminés à la condensation des autres composés est proportionnellement plus importante chez la Callune que chez le Hêtre.

Par ailleurs, notons également que, tout l'azote hydrosoluble de la Callune est sous forme aminée, ce qui n'est pas le cas avec le Hêtre. En effet, les produits de dégradation de la chlorophylle notamment, contiennent des composés à azote hétérocyclique.

IV.- CONCLUSION

Les principaux résultats obtenus sont regroupés dans les figures 6 à 9. La comparaison des deux stations de Hêtre ne fait pas apparaître de différences importantes dans la nature des produits extraits ; les différences sont essentiellement d'ordre quantitatif.

Les hydrosolubles de Hêtre sont les plus riches en azote, mais les plus pauvres en cycles aromatiques, notamment en diphénols. Ceci est important du fait de la réactivité particulière des phénols avec les acides aminés (NEFEDOVA et al., 1970).

Ainsi, dans le cas de l'hydrosoluble de Callune, nous observons une forte libération d'acides aminés après la rupture des liaisons peptidiques provoquée par l'hydrolyse acide ; cette libération est proportionnellement nettement plus importante que chez le Hêtre. Il apparaît donc que les acides aminés de la Callune participeraient relativement plus à la formation d'édifices condensés que chez le Hêtre.

Par ailleurs, l'analyse de la densité optique des extraits, tant en lumière visible qu'en lumière ultra-violette, nous montre que si les hydrosolubles de Callune sont plus riches en composés aromatiques que ceux de Hêtre, ces produits sont naturellement plus polymérisés dans le second cas que dans le premier. Donc, indépendamment de la différence de réactivité que pourraient présenter les phénols de la Callune par rapport à ceux du Hêtre, ceux-ci interviendront moins lors de l'humification, puisqu'ils sont bloqués dès le départ.

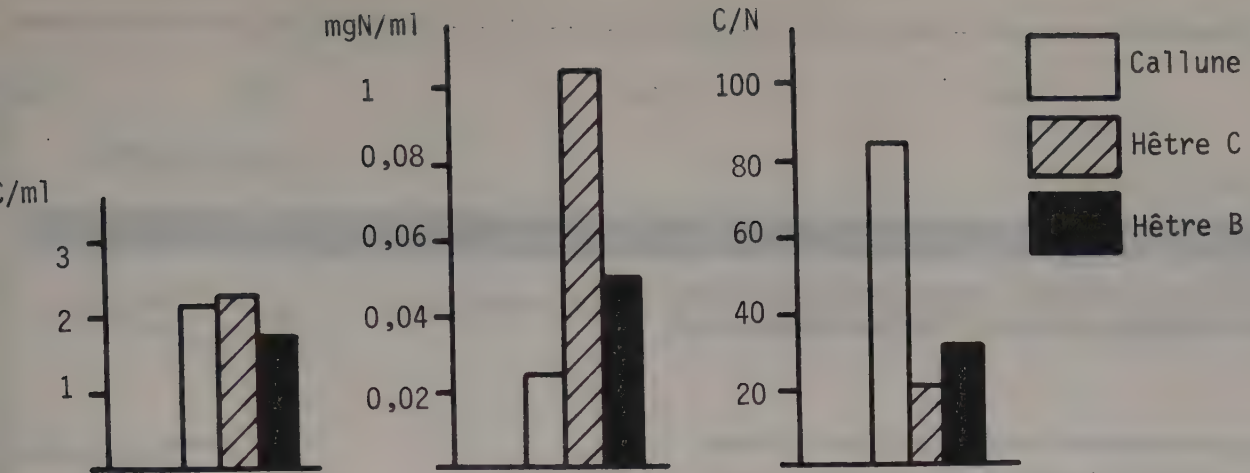


Figure 6.- Composition élémentaire des hydrosolubles

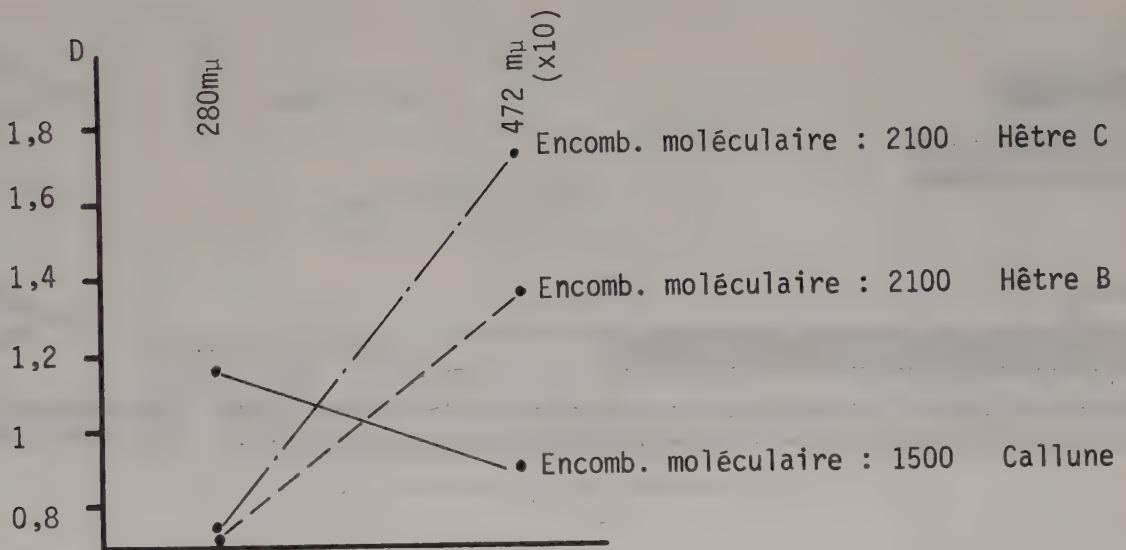


Figure 7.- Densité optique et encombrement moléculaire

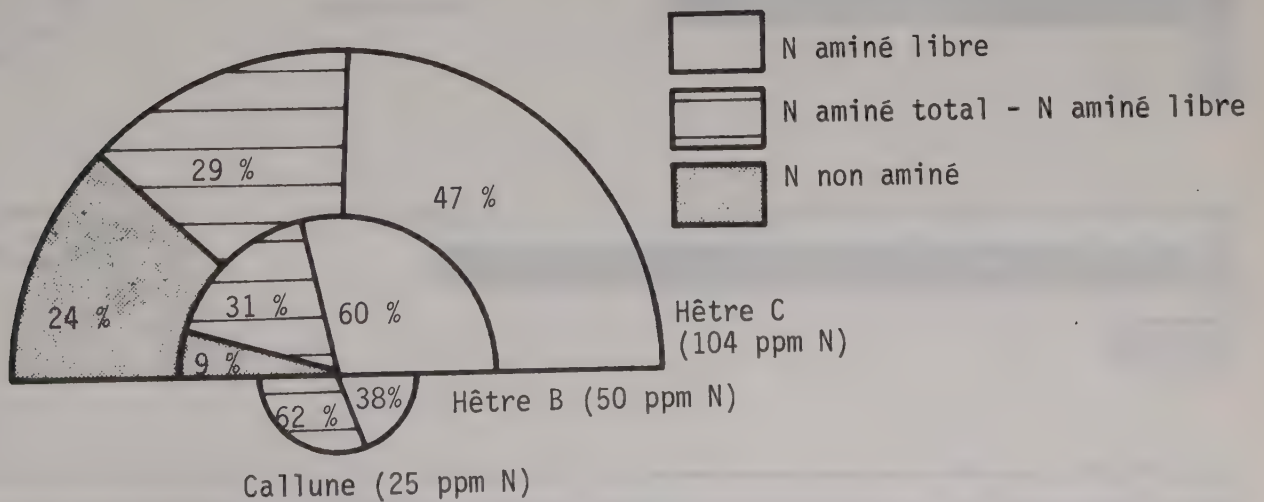


Figure 8.- Répartition de l'azote aminé dans la fraction azotée

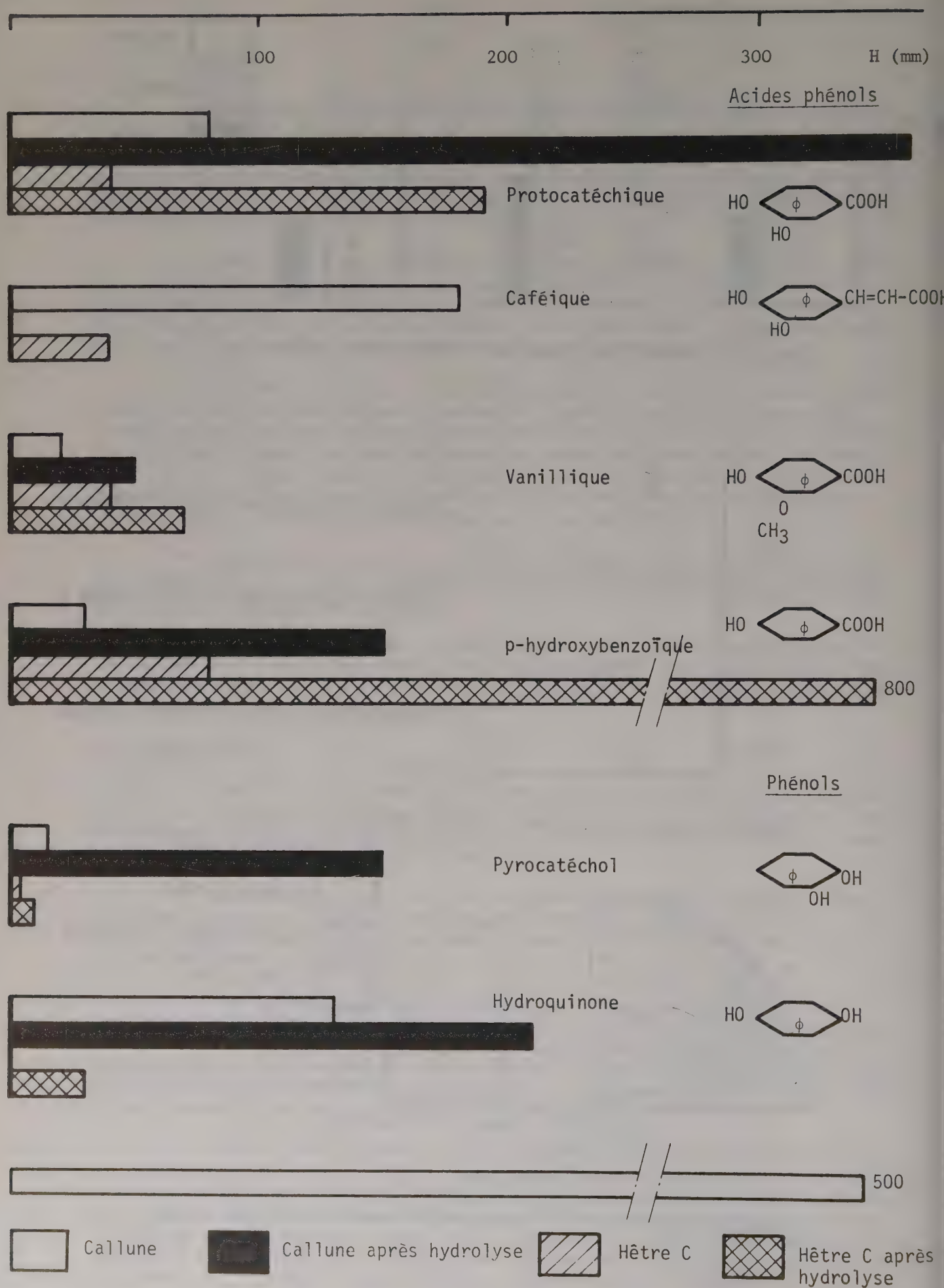


Figure 9.- Principaux phénols et acides phénols de la Callune

TROISIEME PARTIE

EVOLUTION DES COMPOSES HYDROSOLUBLES
PAR INCUBATION EN MILIEU LIQUIDE

EVOLUTION DES COMPOSES HYDROSOLUBLES
PAR INCUBATION EN MILIEU LIQUIDE

Pour étudier l'évolution des composés hydrosolubles des litières de Hêtre et de Callune, nous les avons mis à incuber pendant 25 jours, à 28°C. Cette incubation en milieu liquide (méthode POCHON) a permis un développement de la microflore, tant bactérienne que fongique, apportée par les hydrosolubles aux dépens du substrat carboné présent.

Ainsi s'est donc produite une transformation des produits solubilisés à partir des résidus végétaux, sous la seule influence des microorganismes présents et du système enzymatique provenant des litières, à l'exclusion de toute action d'ordre physico-chimique qui se produirait en présence d'un substrat minéral. Notons qu'une telle méthode d'incubation crée, du fait de l'évolution en phase liquide, un milieu semi-anaérobie ; des conditions semblables ne s'observent que de façon relativement fugace dans la nature, à l'occasion d'une période d'engorgement : nous aurions ainsi amplifié un phénomène naturel en le prolongeant dans le temps et en augmentant son intensité par l'élévation de la température.

I.- DEGRADATION MICROBIENNE

Les hydrosolubles ont été mis à incuber et nous les avons laissés évoluer sous l'action de la microflore bactérienne et fongique qu'ils contenaient. L'activité de ces microorganismes a été suivie par l'intermédiaire du dégagement de CO₂ mesuré quotidiennement (Figure 10). Le carbone ainsi dégagé ne provient pas uniquement des produits (acides aminés et composés phénoliques) que nous avons étudiés, mais de l'ensemble des produits carbonés présents dans les hydrosolubles, sans qu'il soit possible, par cette technique, de faire la part des différentes familles de composés.

Tableau 17.- Taux de minéralisation des hydrosolubles après 25 jours d'incubation (% du C total)

Callune	Hêtre C	Hêtre B
40,50	44,90	44,00

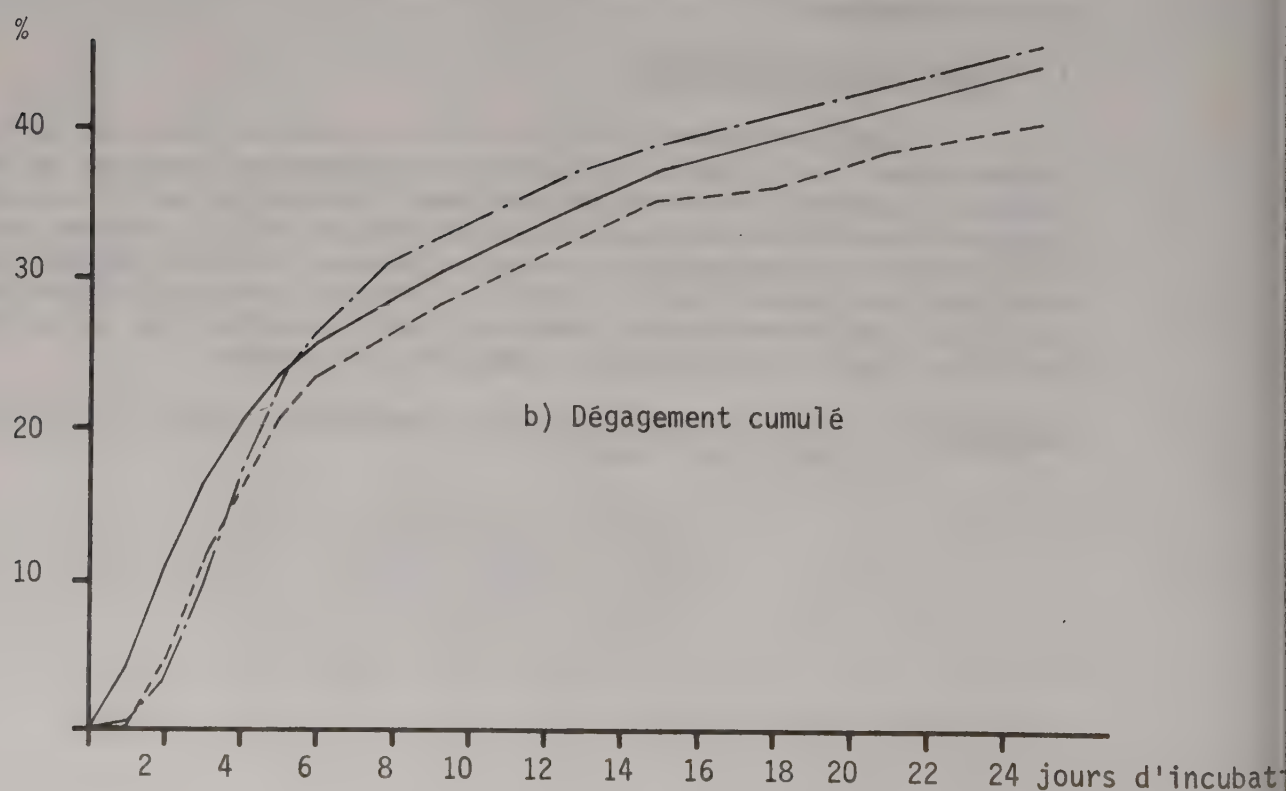
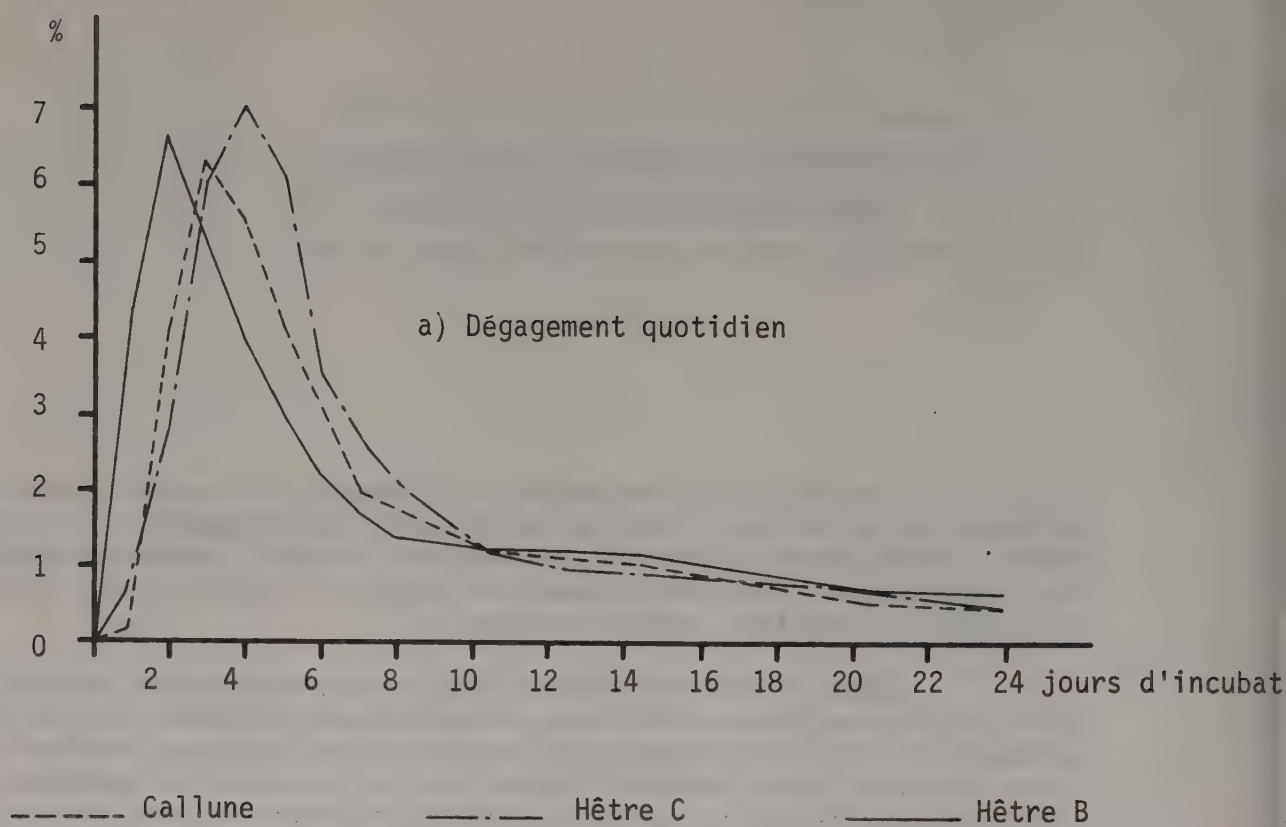


Figure 10.- Minéralisation du carbone en CO_2 (en % du C total)

Nous voyons donc que les taux de minéralisation sont importants puisque près de la moitié du carbone total est dégagé sous forme de CO_2 après 25 jours d'incubation. Nous retrouvons là une caractéristique de la matière organique fraîche, chimiquement jeune (JENKINSON, 1965). Les dégagements totaux observés avec les deux hydrosolubles de Hêtre ne sont pas significativement différents, puisque leur écart est inférieur à 2 % des quantités mises en jeu. Par contre, à l'hydrosoluble de Callune correspond un taux de minéralisation sensiblement plus bas (environ 10 % de moins).

L'étude du dégagement quotidien des deux hydrosolubles de Hêtre fait également apparaître un maximum légèrement supérieur à celui de la Callune (Tableau 18).

Tableau 18.- Maximum de dégagement quotidien (% du C total)

Callune	Hêtre C	Hêtre B
6,3	6,9	6,6

Cependant, ces maxima ne se produisent pas simultanément. La microflore provenant de la station de Bezange (Hêtre B) a un développement très rapide et le maximum est atteint dès le deuxième jour. Pour la seconde station de Hêtre, le maximum n'a lieu que le quatrième jour. La Callune, elle, culmine entre les deux, le troisième jour. Les courbes cumulatives du dégagement de CO_2 montrent pour l'hydrosoluble de Hêtre B une vitesse de minéralisation rapide dès le premier jour, alors que pour les deux autres, l'activité microbienne ne devient importante que le deuxième jour.

Par ailleurs, l'action microbienne est rapide puisque dans tous les cas, environ 75 % du carbone minéralisé l'est dès le dixième jour.

Quelles que soient les cinétiques observées, elles sont assez voisines dans les trois cas, et il est vraisemblable que les microflores soient en fait peu différentes. Le plus important est de noter la minéralisation sensiblement plus faible des composés hydrosolubles de la Callune.

II.- TRANSFORMATIONS MICROBIENNES

L'activité des microorganismes se traduit par un dégagement de CO_2 , mais également par une série de transformations biochimiques des composés initialement hydrosolubles ; transformation ne s'effectuant pas dans le sens d'une destruction des molécules, mais d'une réorganisation de tous ces composés entre eux.

1.- Bilan du carbone

Au cours de l'incubation apparaît un dépôt formé par la précipitation de produits condensés. Au niveau du bilan, nous distinguerons donc trois fractions : le carbone dégagé par minéralisation, celui qui est dans le précipité et celui qui reste hydrosoluble. C'est cette fraction hydrosoluble que nous étudierons plus en détail.

Tableau 19.- Répartition du carbone après incubation (en % du carbone total hydrosoluble avant incubation).

	CO ₂	Hydrosoluble	Culot	Perte
Callune	40,5	38,1	11,4	10,0
Hêtre C	44,9	26,4	12,5	16,2
Hêtre B	44,0	37,4	13,8	4,8

Le culot qui se forme au cours de l'incubation a deux origines : il est en partie constitué par des microorganismes qui se développent, puisant le carbone dont ils ont besoin dans les composés hydrosolubles et en partie par les produits insolubles formés au cours de l'incubation. Ce culot est séparé de la phase liquide par centrifugation à 14 000 tours/mn pendant 15 mn.

Nous constatons qu'une partie du carbone est perdue au cours de l'incubation, surtout dans le cas du Hêtre C où la perte atteint 16 % (Tableau 19). Il est vraisemblable qu'une partie du carbone manquant soit dégagé sous forme de composés volatils, autres que le CO₂, donc non décelables avec notre système d'analyse. En effet, selon NEUNYLOV *et al.* (1968), si l'humidité augmente, lors de minéralisations en présence de sols, la quantité de carbone dégagé sous une forme autre que CO₂ croît également ; particulièrement pour une humidité s'élevant à 120 % de la capacité de rétention où les pertes atteignent 30 % en 7 mois. Dans le cas présent, l'incubation se déroule dans un milieu uniquement aqueux, montrant une certaine tendance à la réduction : le Eh des hydrosolubles est voisin de 500 mV avant l'incubation, et diminue au cours de celle-ci (tableau 20).

Tableau 20.- Potentiel Redox des hydrosolubles après incubation.

	Callune	Hêtre C	Hêtre B
Eh (mv)	370	300	360

Notons en outre que le Eh de l'hydrosoluble incubé du Hêtre C est nettement plus faible que les deux autres, et que c'est précisément dans ce cas que la perte de carbone est la plus importante. Ceci semble confirmer l'hypothèse faite ci-dessus.

En ce qui concerne la répartition du carbone dans les trois phases apparues au cours de l'incubation, les différences se situent surtout au niveau du carbone restant hydrosoluble en fin d'expérience. En effet, plus encore que pour le carbone minéralisé, les quantités localisées au niveau du culot sont comparables dans les trois cas. Cependant, la différence Hêtre - Callune n'apparaît plus ici ; le Hêtre C - du fait sans doute de son faible Eh - perd beaucoup de carbone, et cette perte se fait aux dépens de la fraction hydrosoluble : les deux hydrosolubles de Callune et du Hêtre B ont une proportion nettement plus importante de leur carbone qui reste sous cette forme.

2.- Bilan de l'azote

Nous trouvons ici aussi une perte importante dans le bilan azoté des hydrosolubles en fin d'incubation, avec toujours un déficit plus creusé pour le Hêtre C (Tableau 21).

Tableau 21.- Répartition de l'azote après incubation (en % de l'azote total hydrosoluble avant incubation)

	Hydrosoluble	Culot	Perte
Callune	18,2	59,9	21,9
Hêtre C	14,0	40,8	45,2
Hêtre B	17,4	53,2	29,4

Lors de réactions entre des amino-acides et des diphénols, il peut se produire une désamination des fonctions aminées (HALDER et al., 1965). S'il n'a pas été possible de mesurer le dégagement gazeux d'azote lors de la minéralisation, nous verrons plus loin que l'évolution de la fraction aminée permet de confirmer cette interprétation.

Par ailleurs, contrairement à ce que nous observions pour le carbone, il ne reste plus qu'une faible proportion de l'azote dans les composés encore hydrosolubles en fin d'incubation et, plus de la moitié du stock azoté initial (sauf pour le Hêtre C) se retrouve dans le culot. Ce fait a deux origines possibles : l'azote peut être comparativement plus nécessaire aux micro-organismes que le carbone, il peut également, davantage que celui-ci, être entraîné lors de l'insolubilisation biochimique de certains composés.

3.- Comparaison carbone-azote

La valeur du C/N des différentes fractions en fin d'incubation permet de comparer les composés hydrosolubles et insolubilisés entre eux et au matériau initial (Tableau 22).

Tableau 22.- Variations du rapport C/N du fait de l'incubation

	Hydrosoluble frais			Après incubation	
	C mg/ml	N mg/ml	C/N	C/N hydrosoluble	C/N culot
Callune	2,15	25,2	85,3	178,4	16
Hêtre C	2,30	104,3	22,0	41,4	7
Hêtre B	1,70	50,4	33,7	72,6	9

Au cours de l'incubation, les valeurs du C/N des produits restant en solution doublent dans tous les cas, par rapport à celles des hydrosolubles frais ; nous obtenons ainsi un C/N très élevé pour la Callune. La perte d'azote est donc deux fois plus rapide que celle du carbone et est, en valeurs relatives, aussi importante avec la Callune qu'avec les deux Hêtres.

Dans le culot, les produits insolubilisés lors de l'incubation ont un C/N de 3 à 5 fois plus faible que celui de l'hydrosoluble initial correspondant, montrant bien une accumulation de l'azote à ce niveau ; celle-ci est sensiblement plus importante chez la Callune que chez le Hêtre.

Il apparaît donc qu'au terme d'une évolution de ce genre, les composés azotés ont tendance à s'insolubiliser et à se fixer, et qu'une faible partie de l'azote initial garde la possibilité d'évoluer encore en phase liquide. La majeure partie du carbone présent reste au contraire dans les composés solubles.

4.- Evolution du pH

Le pH diminue pendant les premiers jours, puis augmente ensuite (tableau 23) pendant l'incubation.

Tableau 23.- Evolution du pH au cours de l'incubation.

	Nombre de jours d'incubation			
	0	1	6	15
Callune	4,3	4,1	3,1	3,8
Hêtre C	4,7	4,6	5,7	7,1
Hêtre B	5,0	4,7	5,6	7,2

Avec les deux hydrosolubles de Hêtre, le pH diminue légèrement au début, puis il augmente assez rapidement pour atteindre la neutralité après 15 jours d'incubation. Dans l'extrait de Callune, l'acidification est plus importante, puisque le pH s'abaisse de plus d'une unité, et elle se prolonge presque une semaine. La remontée du pH est ensuite très lente et à peine amorcée au bout de la deuxième semaine.

Les conditions d'incubation étant semi-anaérobies, nous avons suivi l'évolution du pH d'hydrosolubles incubés dans les mêmes conditions, mais agités, donc oxygénés (Tableau 24).

Tableau 24.- Evolution du pH au cours d'une incubation en milieu oxygéné.

	Nombre de jours d'incubation				
	0	1	4	8	25
Callune	4,3	3,8	3,3	3,5	6,1
Hêtre C	4,7	5,7	7,6	8,6	8,6

Les variations du pH sont dans ce cas beaucoup plus rapides que dans l'incubation précédente, mais nous y retrouvons les mêmes tendances. Pour le Hêtre, l'alcalinisation du milieu est sensible, et un palier stable (pH = 8,6) est atteint dès le huitième jour. Pour la Callune, on observe toujours une acidification au cours de la première semaine puis une remontée lente et régulière du pH. Contrairement à ce qui se produit avec le Hêtre, l'hydrosoluble reste toujours acide pendant cette période et aucun palier n'apparaît.

Il y a là une différence de comportement très sensible entre les deux végétaux : les extraits de Hêtre ont la possibilité d'induire une élévation du pH, alors que ceux de Callune maintiennent une ambiance nettement plus acide.

Certains auteurs (SAITO, 1960) attribuent l'augmentation du pH à l'action de la population microbienne, mais sans en préciser le mécanisme. Ceux-ci ne sont sans doute pas les seuls à intervenir, puisque les souches présentes dans les trois hydrosolubles sont sensiblement les mêmes et que la différence apparaît liée aux végétaux. Il ne semble pas que ce processus doit dû à l'effet d'ammoniaque libéré dans la solution, puisque le dosage à la ninhydrine donne des résultats décroissants quand le pH augmente. En outre, la décarboxylation ne suffit pas à expliquer la forte alcalinisation observée chez le Hêtre. Il est possible que des bases organiques soient libérées au cours de l'incubation, cela pourrait expliquer de tels pH.

5.- Encombrement moléculaire

Nous avons comparé les courbes correspondant aux passages sur gel Séphadex G 25 d'un hydrosoluble frais et du même produit, après 25 jours d'incubation (Figure 11).

a.- Callune

Le même pic retenu apparaît avant et après l'incubation, correspondant à un encombrement moléculaire de 2 800. Nous avons donc analysé les courbes en les divisant en trois parties : le pic principal, ce qui le suit et ce qui le précède. Ainsi, les coupures ont été établies pour des encombrements moléculaires de l'ordre de 3 200 et 2 400. Les valeurs des surfaces mesurées ont été corrigées de façon à les ramener au cas d'une dépose fictive de 1 mg de carbone (Tableau 25).

Tableau 25.- Evolution de l'encombrement moléculaire de l'hydrosoluble de Callune après incubation.

	Surface		%	
	frais	incubé	frais	incubé
> 3 200	613	2 316	24	35
3 200 - 2 400	1 830	3 036	70	47
< 2 400	157	1 168	6	18
Total	2 600	6 520	100	100

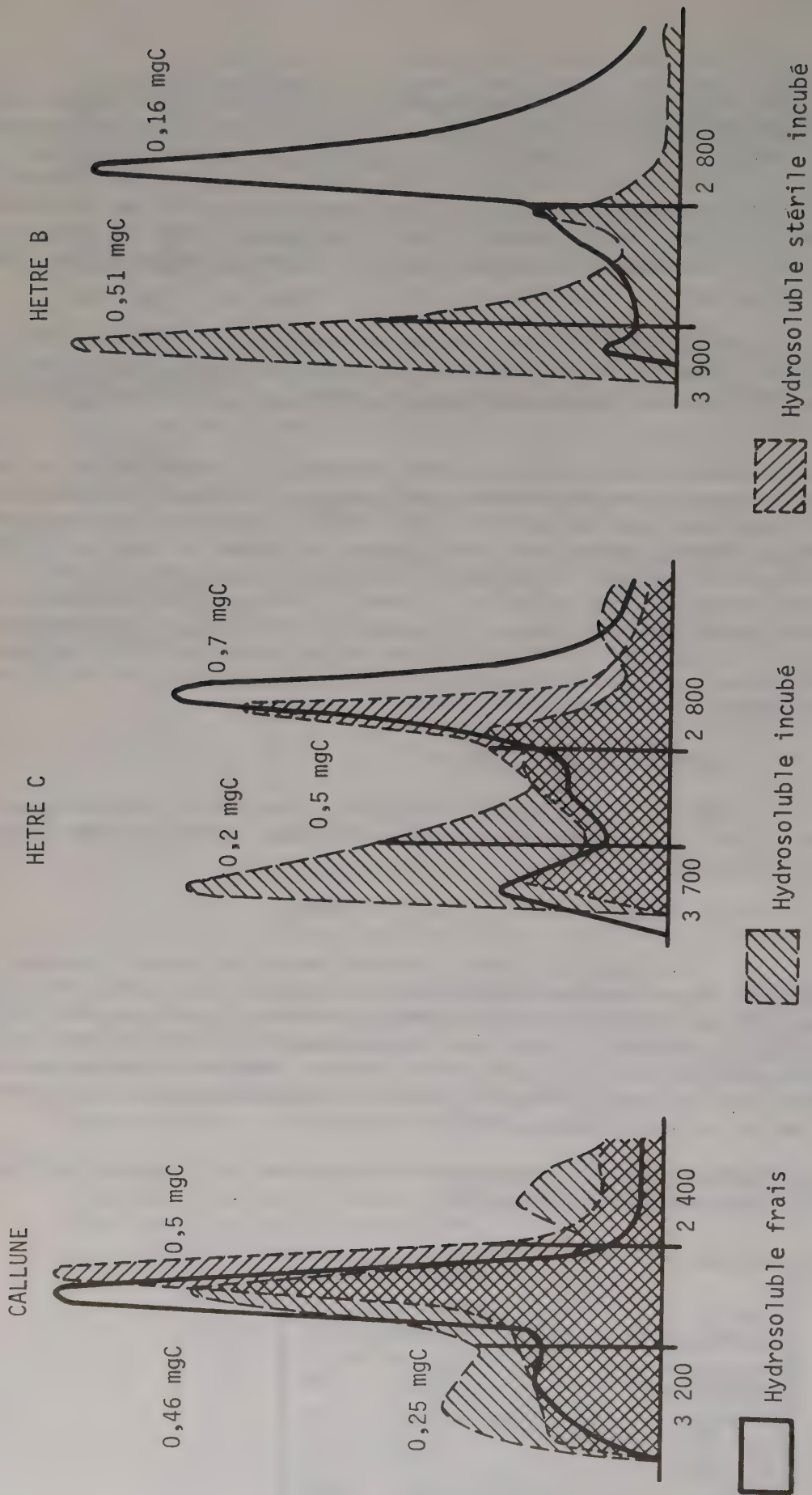


Figure 11.- Evolution de l'encombrement des hydrosolubles après l'incubation.

Nous constatons une diminution importante de la fraction médiane, correspondant au pic principal, et une augmentation des deux autres fractions. Deux transformations opposées s'exercent donc simultanément, d'une part la condensation de composés d'encombrements moléculaires voisins de 2 800, et d'autre part, la destruction de chaînes latérales aboutissant à une diminution de l'encombrement vis-à-vis du Gel Séphadex.

Un échantillon d'hydrosoluble mis à incuber après stérilisation, donc ne pouvant évoluer que sous l'action du système enzymatique qu'il contient au départ, montre également une diminution de l'importance des composés médians, mais au seul profit des produits les plus petits (Tableau 26).

Tableau 26.- Répartition du carbone en fonction de l'encombrement moléculaire après une incubation en milieu stérile

	> 3 200	3 200 - 2 400	< 2 400
Echantillon incubé stérile	26	61	13

Il semble donc que les microorganismes agissent essentiellement dans le sens d'un accroissement de la condensation des composés ; leur rôle serait moins important vis-à-vis de la diminution de l'encombrement moléculaire. Cependant, nous ne décelons ici qu'un bilan global, il est donc possible que les microorganismes aient une action sensible au niveau de la destruction de chaînes latérales compensée par une augmentation de la condensation encore plus forte que celle que nous mesurons.

Par ailleurs, nous observons également que la surface totale de la courbe enregistrée est plus grande après l'incubation : cela traduit l'augmentation de l'absorption de l'hydrosoluble vis-à-vis de la longueur d'onde utilisée pour la détection, à savoir 280 mμ. Nous reviendrons sur ce point lors de l'étude de l'évolution de la densité optique.

b.- Hêtre

Comme nous l'avions vu avec la Callune, nous retrouvons sensiblement les mêmes types de composés avant et après l'incubation. Dans ce cas, nous avons établi des coupures identiques pour les deux stations du Hêtre C et du Hêtre B, correspondant à des encombrements moléculaires de 3 700 et 2 800 (Tableaux 27a et 27b).

Tableau 27a.- Evolution de l'encombrement moléculaire de l'hydrosoluble du Hêtre C après incubation

	Surface			%		
	Frais	stérile	incubé	frais	stérile	incubé
> 3 700	321	366	3 363	17	17	46
3 700 - 2 800	321	666	2 279	17	30	31
< 2 800	1 248	1 158	1 638	66	53	23
Total	1 890	2 190	7 280	100	100	100

Tableau 27b.- Evolution de l'encombrement moléculaire de l'hydrosoluble du Hêtre B après incubation

	Surface		%	
	Frais	incubé	Frais	incubé
> 3 700	97	4 150	4	58
3 700 - 2 800	506	2 213	19	31
< 2 800	2 020	756	77	11
Total	2 624	7 119	100	100

L'évolution est dans ce cas beaucoup plus marquée que pour la Callune. En effet, chez celle-ci la fraction 3 200 - 2 400 diminue lors de l'incubation, mais reste malgré tout la plus importante. Pour les hydrosolubles de Hêtre, la fraction la plus petite, qui est la plus abondante au début devient minoritaire en fin d'incubation ; la fraction dont l'encombrement moléculaire est supérieur à 3 700 devient prépondérante par rapport aux autres alors qu'elle était la moins abondante avant l'incubation. Pour les deux stations de Hêtre, l'évolution se fait dans le même sens, elle est cependant plus intense avec le Hêtre B.

Dans l'échantillon incubé stérilement, comme chez la Callune, nous ne constatons aucune incidence au niveau des composés d'encombrements moléculaires les plus grands ; mais il se produit quand même une certaine condensation au profit de la fraction 3 700 - 2 800, aux dépens de la fraction inférieure à 2 800.

En ce qui concerne l'augmentation de la surface des courbes, elle est également plus forte que pour la Callune, mais ici aussi elle est due exclusivement à l'action des microorganismes puisqu'elle est négligeable si l'hydrosoluble a été stérilisé avant l'incubation.

Pour étudier la cinétique de l'évolution des caractéristiques biochimiques des hydrosolubles (densité optique, phénols et acides aminés), nous avons mis à incuber dans une étuve, à 28°C également, un certain nombre d'échantillons que nous prélevons au fur et à mesure des besoins.

6.- Densité optique

a.- Visible

Le rapport Q 4/6 auquel nous ne pouvions pas nous fier pour comparer le degré de condensation des différents hydrosolubles, peut être utilisé pour mesurer l'évolution d'un hydrosoluble au cours de l'humification (tableau 28).

Nous voyons que ce rapport décroît dans tous les cas, ce qui, ainsi que nous l'avions vu dans le chapitre précédent, indique une augmentation de la condensation des produits hydrosolubles. Cette analyse vient donc confirmer les résultats obtenus par filtration sur gel Séphadex.

Tableau 28.- Evolution du Q 4/6 en fonction du temps d'incubation

	Nombre de jours d'incubation		
	0	6	15
Callune	6,4	5,2	4,6
Hêtre C	10,2	9,1	4,1
Hêtre B	6,5	4,4	3,7

Le Q 4/6 diminue pour atteindre des valeurs plus proches de celles que l'on observe de façon courante pour la matière organique des sols, ce qui reflète bien une évolution biochimique des composés organiques présents.

b.- Ultraviolet

Comme l'absorption des longueurs d'ondes visibles, la densité optique des hydrosolubles vis-à-vis des radiations ultraviolettes augmente nettement au cours de l'incubation (Tableau 29).

Tableau 29.- Evolution du coefficient d'absorption à 280 m μ en fonction du temps d'incubation (0,1 mg de C/ml)

	Nombre de jours d'incubation		
	0	6	15
Callune	1,14	1,20	1,70
Hêtre C	0,73	1,35	1,85
Hêtre B	0,72	1,06	2,22

Cette augmentation traduit donc un accroissement de la concentration des noyaux phénoliques dans les hydrosolubles. Cette évolution est en outre beaucoup plus intense pour les deux extraits de Hêtre que pour celui de Callune (Tableau 30).

Tableau 30.- Augmentation de la densité optique à 280 m μ après 15 jours d'incubation

	Callune	Hêtre C	Hêtre B
$\frac{Do (280)^0}{Do (280)^{15}}$	1,49	2,53	3,08

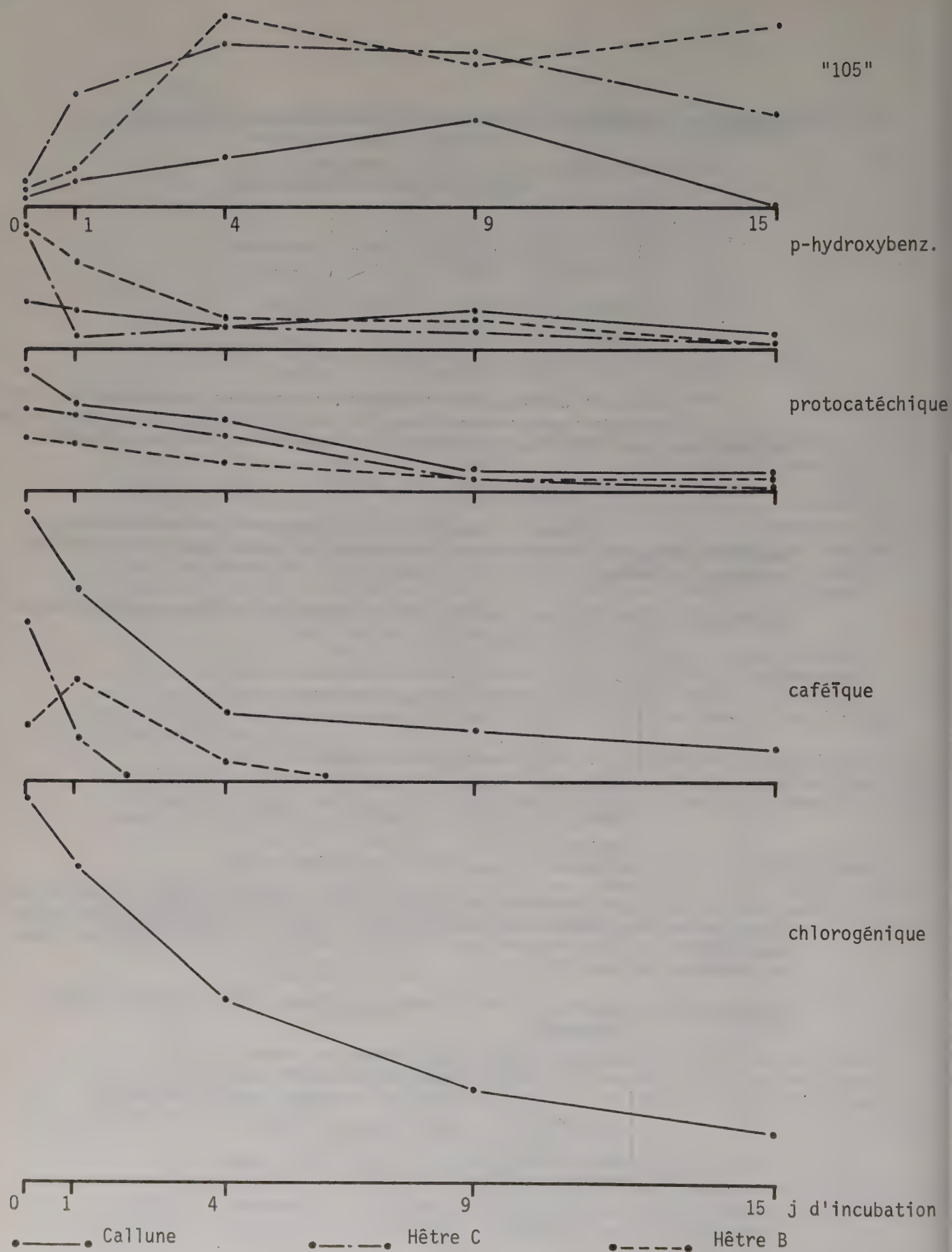


Figure 12.- Evolution des principaux acides phénols au cours de l'incubation.

7.- Evolution des composés phénoliques simples

a.- Acides phénols

Tous les acides phénols diminuent au cours de l'incubation suivant une évolution voisine dans les trois hydrosolubles (figure 12). Cependant, à la sortie de la colonne chromatographique, nous constatons que deux acides augmentent malgré tout au début ; ceux qui sortent à 105°C et 132°C. Mais, vu leur position de sortie dans la chromatographie en phase gazeuse, il est très possible que ce soit des acides aliphatiques dus à l'activité de la microflore. Notons cependant que ces produits sont nettement plus abondants chez le Hêtre que chez la Callune, sans doute à cause de la plus grande quantité de chaînes aliphatiques qu'on y trouve. Par ailleurs, ils disparaissent chez la Callune, au bout de 9 jours pour le "132", 15 jours pour le "105" ; bien qu'abondants, ils diminuent également chez le Hêtre à la fin de cette période d'incubation.

Dans l'ensemble, la diminution des acides phénols est ici un phénomène régulier, faisant apparaître une décroissance progressive et générale, rarement une destruction brutale et sélective comme après l'hydrolyse. Seuls les acides caféique et p-coumarique disparaissent rapidement et totalement dans les hydrosolubles de Hêtre. Cette évolution peut se faire selon plusieurs processus différents. Les deux voies les plus probables, qui peuvent se produire simultanément, sont la décarboxylation des fonctions acides et la condensation des molécules en édifices plus complexes.

Comme c'était le cas avec les hydrosolubles frais, l'hydrolyse acide libère, à partir des hydrosolubles incubés, de l'acide oxalique en quantité importante chez la Callune, et plus limitée chez le Hêtre. A part cet acide aliphatique, les seuls acides phénols sur lesquels l'hydrolyse acide a une action sensible sont le p-hydroxybenzoïque et le protocatéchique qui apparaissent en plus grande quantité à l'état libre après ce traitement. La libération d'acides phénols ainsi provoquée se fait surtout en faveur de l'acide protocatéchique pour la Callune et de l'acide p-hydroxybenzoïque pour le Hêtre ; elle est en outre plus importante. Assez paradoxalement, semble-t-il, c'est le protocatéchique qui augmente le plus avec le Hêtre B, où la libération d'acides phénols est plus importante que dans l'autre station de Hêtre.

Quoi qu'il en soit, il est manifeste qu'une partie des acides phénols est incorporée sans décarboxylation préalable ; les liaisons ainsi établies peuvent être facilement rompues et les acides libérés par l'hydrolyse. Nous pouvons également penser que si les acides p-coumarique et protocatéchique ont un rôle particulier dans ces réactions, c'est que l'action des microorganismes provoque une simplification des structures, visant à remplacer certaines fonctions par des groupements hydroxyles (BREMNER, 1965).

b.- Phénols

Contrairement à ce que nous observions pour les acides phénols, les phénols proprement dits ne diminuent pas pendant l'incubation (Figure 13), ils restent dans l'ensemble stables au cours de 15 jours d'incubation.

Si l'on hydrolyse les hydrosolubles incubés, les produits qui ressortent nettement dans tous les cas sont l'hydroquinone et le pyrocatechol.

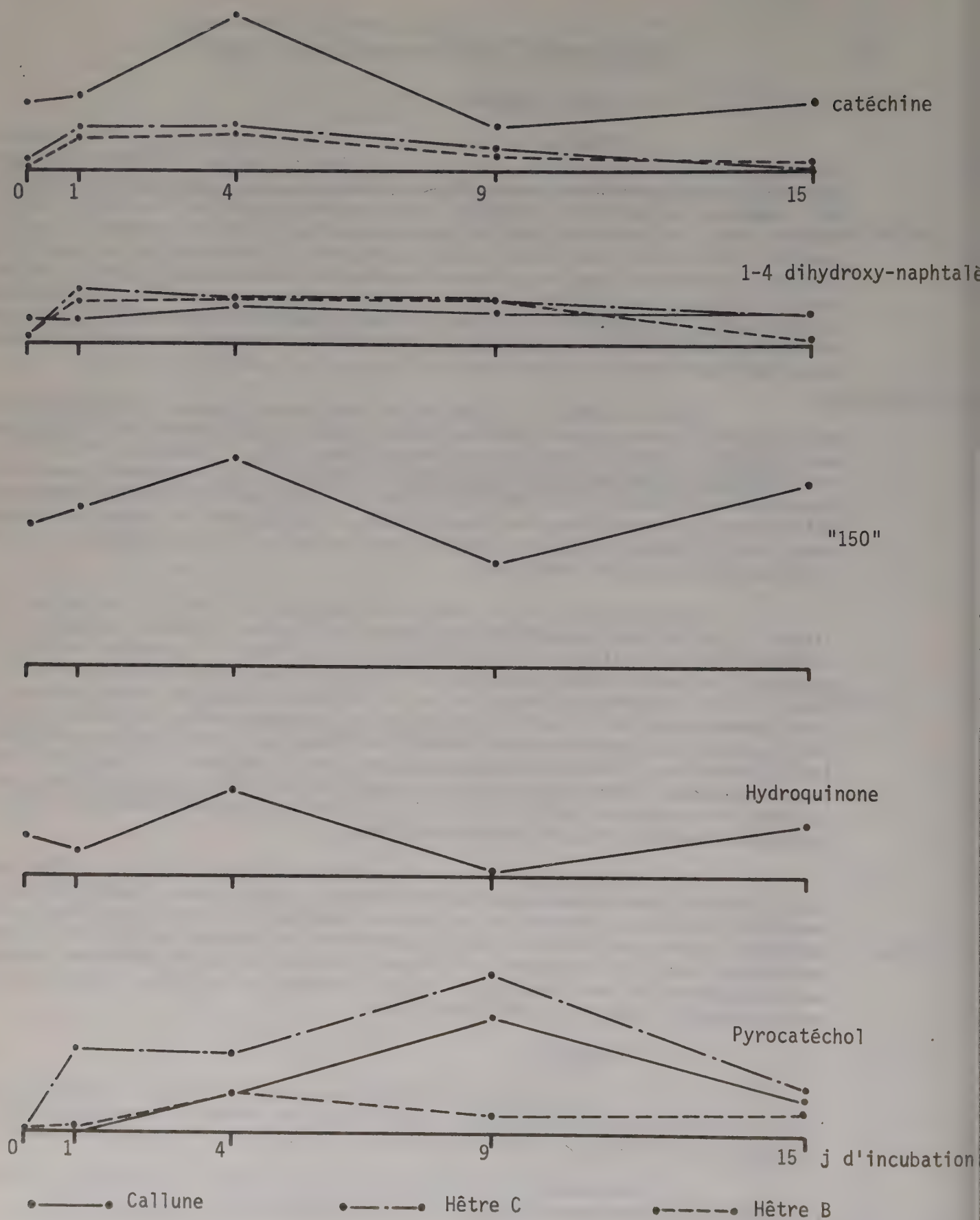
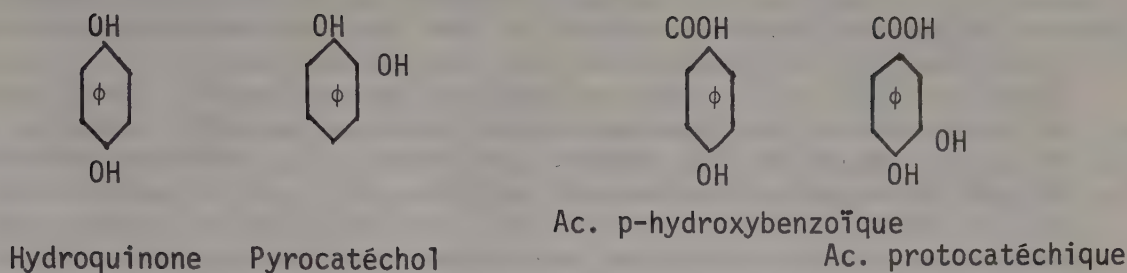


Figure 13.- Evolution des principaux phénols au cours de l'incubation .



Nous constatons que ces structures sont très voisines et que les groupements "OH" semblent jouer un grand rôle dans le comportement des cycles aromatiques ; en outre, les noyaux dihydroxylés paraissent être les plus importants.

8.- Evolution des acides aminés

Une étude qualitative, par chromatographie sur papier, ne nous permet pas de déceler de différences dans le comportement des acides aminés : nous retrouvons après l'incubation ceux que nous avons décelés dans l'hydrosoluble frais et aucun ne paraît avoir évolué de façon plus ou moins intense que les autres. Nous nous sommes donc limités à une analyse quantitative globale des acides aminés libres et des acides aminés totaux (tableau 31).

Tableau 31.- Répartition de l'azote aminé en pour cent de l'azote total hydrosoluble, avant et après l'incubation.

Nombre de jours d'incubation	Acides aminés libres	Acides aminés totaux	Acides aminés totaux / Acides aminés libres
Callune	0	38	100
	12	11	81
Hêtre C	0	47	76
	12	34	73
Hêtre B	0	60	91
	12	25	69

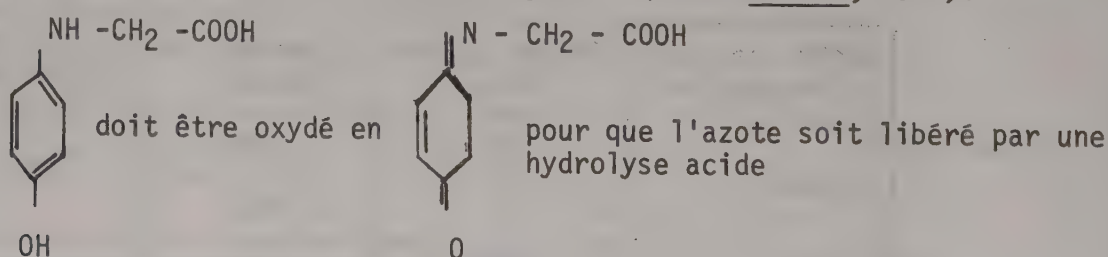
Nous avons vu précédemment que l'azote hydrosoluble diminuait au cours de l'incubation ; en effet, moins de 20 % de l'azote initial est encore sous forme hydrosoluble à la fin de l'expérience ; nous envisageons maintenant l'évolution de la fraction azotée aminée par rapport à l'azote total hydrosoluble.

L'azote aminé libre diminue par rapport à l'azote total hydrosoluble au cours de l'incubation et cette diminution relative est plus importante dans l'hydrosoluble de Callune (3,5 fois moins d'acides aminés libres après l'incubation) que dans ceux de Hêtre (1,4 et 2,4 fois moins d'acides aminés libres après l'incubation).

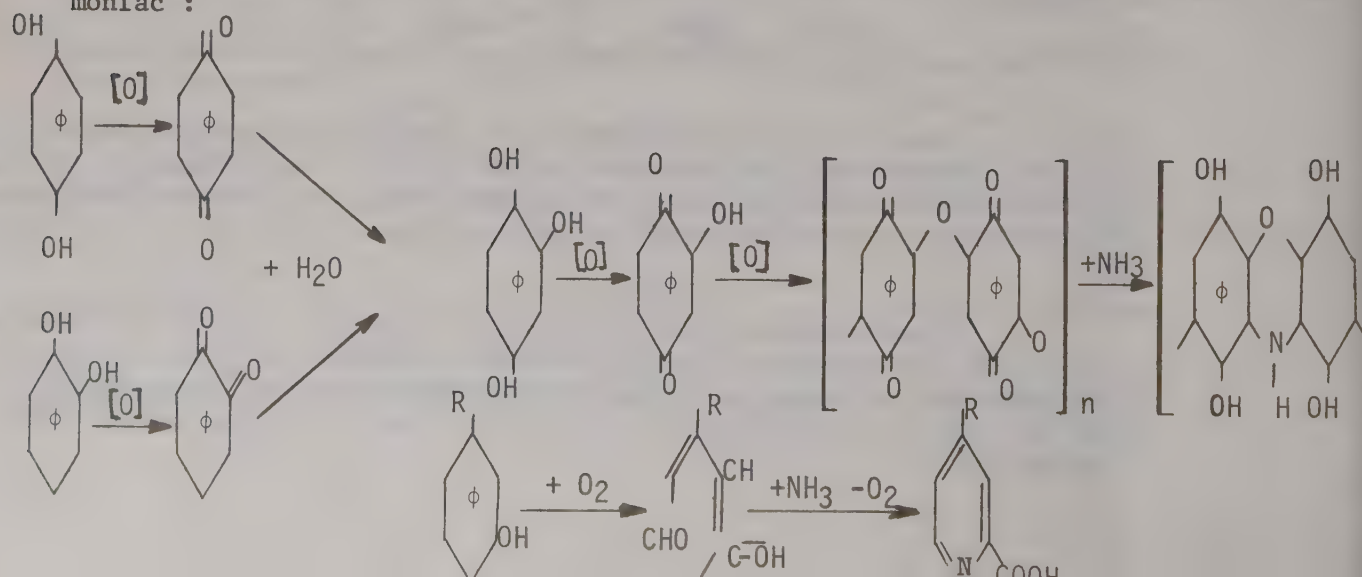
L'azote α -aminé des hydrosolubles est donc relativement plus vulnérable que les autres fractions azotées. Il peut disparaître de plusieurs manières ; certaines réactions de condensation avec des phénols peuvent se faire par désamination (HAIDER et al., 1965). Les conditions de Eh empêchent la nitrification (LAURENT 1972) et d'autre part le pH est insuffisant pour que NH_3 se dégage et, nous l'avons vu, le dosage global à la ninhydrine décroît ; il n'y a donc pas d'accumulation d'ions NH_4^+ en solution. Dans ces conditions, il paraît probable que l'azote libéré se dégage sous forme gazeuse, N_2 . Ces réactions de condensation avec des phénols ne sont pas maximales, mais elles sont très possibles aux pH régnant dans les hydrosolubles en incubation (ADAMS et al., 1973), surtout en fin d'expérience. Ceci pourrait expliquer en partie la perte d'azote que nous constatons ci-dessus. Ensuite, il peut se produire un certain nombre de liaisons peptidiques nouvelles dans lesquelles l'azote α -aminé reste sous forme aminée, mais il est alors masqué à la première analyse et il ne sera apparent qu'après l'hydrolyse : nous le compterons dans la fraction "acides aminés totaux". Enfin, l'azote aminé libre peut être utilisé par le métabolisme microbien et disparaître des hydrosolubles pour se localiser dans le culot.

L'azote aminé total décroît également relativement à l'azote hydrosoluble, sauf avec le Hêtre C où il reste stable.

Avant l'incubation, l'azote aminé représente quasiment la totalité de la fraction azotée de l'hydrosoluble de Callune ; après l'incubation, seulement 80 % de l'azote est aminé. Il se produit donc un changement de la forme sous laquelle se trouvent un certain nombre d'atomes d'azote : ils peuvent se trouver sous forme aminée non libérable par l'hydrolyse acide, ou sous une forme non aminée. En effet, un amino acide lié directement à un cycle phénolique n'est libéré que par une hydrolyse oxydante (PIPER et al., 1972).



Par ailleurs, d'après FLAIG (1950) et BRENNER (1965), il peut exister deux voies possibles pour la formation d'azote hétérocyclique à partir d'ammoniac :



En outre, une matière organique riche en lignine favorise la formation d'azote ammoniacal (PRASAD et al., 1969) et les hydrosolubles de Callune sont extraits à partir des litières où la lignine est la plus abondante.

Nous constatons également qu'au départ des réactions décrites par FLAIG et BREMNER se trouvent des composés phénoliques (hydroquinone et pyrocatechol) dont nous avons remarqué l'importance particulière chez la Callune.

L'évolution du rapport acides aminés totaux/acides aminés libres montre que l'importance des acides aminés libres diminue au cours de l'incubation : ce rapport est presque triplé pour la Callune où nous avons en fin d'expérience un azote aminé libre pour plus de 7 azotes aminés totaux, et il a presque doublé dans les hydrosolubles de Hêtre où nous retrouvons un azote α -aminé pour 2,5 azotes aminés totaux. Les acides aminés libres diminuent plus vite que les acides aminés totaux donc, globalement, la perte d'azote aminé se ferait surtout par perte d'azote aminé libre.

Le fait, également, que l'azote aminé total diminue par rapport à l'azote hydrosoluble montre que la plus grande partie de la perte d'azote hydrosoluble se fait par perte d'azote aminé.

Nous pouvons maintenant esquisser un bilan de l'évolution de l'azote hydrosoluble au cours de l'incubation. La diminution d'azote total hydrosoluble se fait essentiellement par perte d'azote aminé ; dans cette fraction, l'azote aminé libre est le plus attaqué. Cette évolution est plus intense chez la Callune que chez le Hêtre, bien qu'elle porte sur des quantités plus faibles. En outre, il y aurait chez la Callune une réorganisation partielle de l'azote aminé sous des formes différentes.

III.- CONCLUSION

Les principaux résultats que nous avons obtenus sont récapitulés dans les figures 14 à 18.

L'incubation des hydrosolubles permet la minéralisation de près de la moitié du carbone présent dans les extraits de litières ; ce dégagement de CO_2 est sensiblement plus faible avec la Callune qu'avec le Hêtre.

L'activité microbienne provoque également l'insolubilisation d'une partie du carbone (12 % environ). L'analyse du C/N des deux fractions finales (hydrosoluble et précipité) nous montre que le carbone est proportionnellement beaucoup plus abondant dans les composés solubles que l'azote, cela avec les trois hydrosolubles étudiés, mais de façon plus intense avec la Callune.

Il semble donc que, sous l'influence des microorganismes, l'azote tende à être immobilisé beaucoup plus vite que le carbone qui pourrait alors migrer plus facilement. La fraction carbonée qui reste hydrosoluble est beaucoup plus riche en composés phénoliques que l'hydrosoluble initial et les produits qu'elle contient sont nettement plus condensés ; les analyses de densité optique (Q 4/6) nous montrent que la polymérisation se fait de façon nettement plus intense chez le Hêtre que chez la Callune. Parmi les phénols, les di-phénols paraissent jouer un rôle prépondérant. Dans la fraction azotée, les acides aminés sont les plus atteints et l'incubation entraîne une nette augmentation des amino acides liés, surtout chez la Callune où nous retrouvons ainsi une manifestation de l'effet tannant de ce végétal.

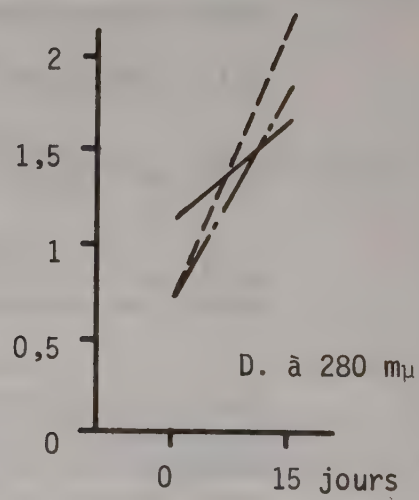
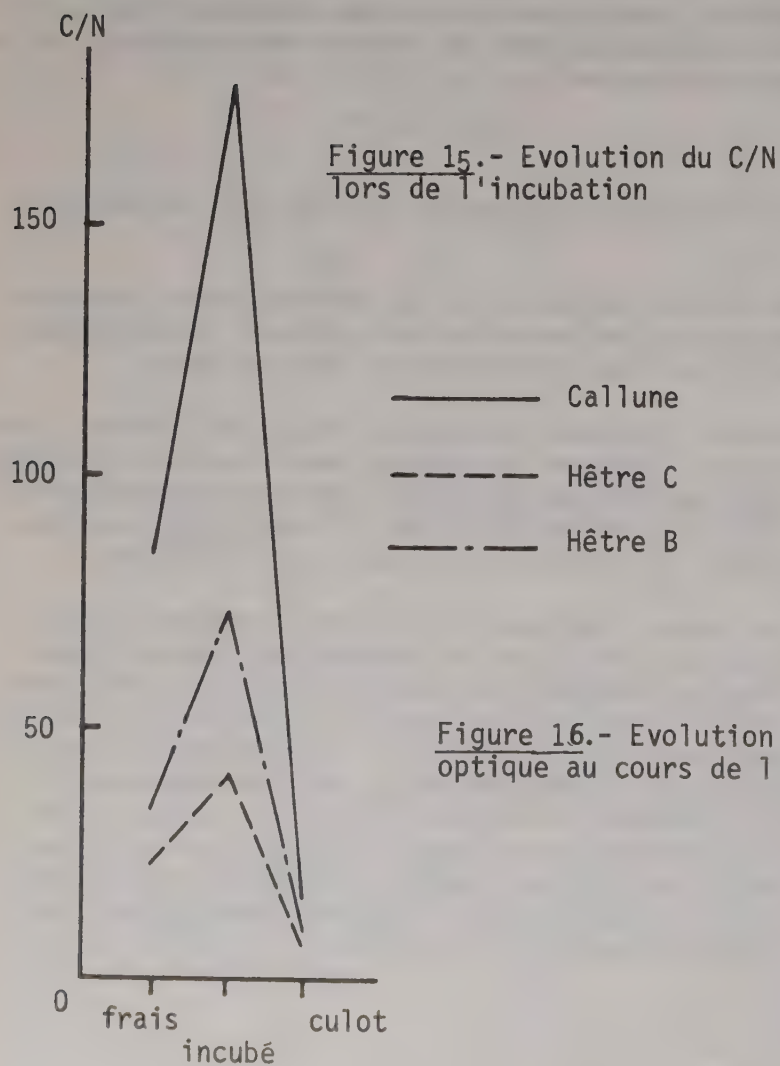
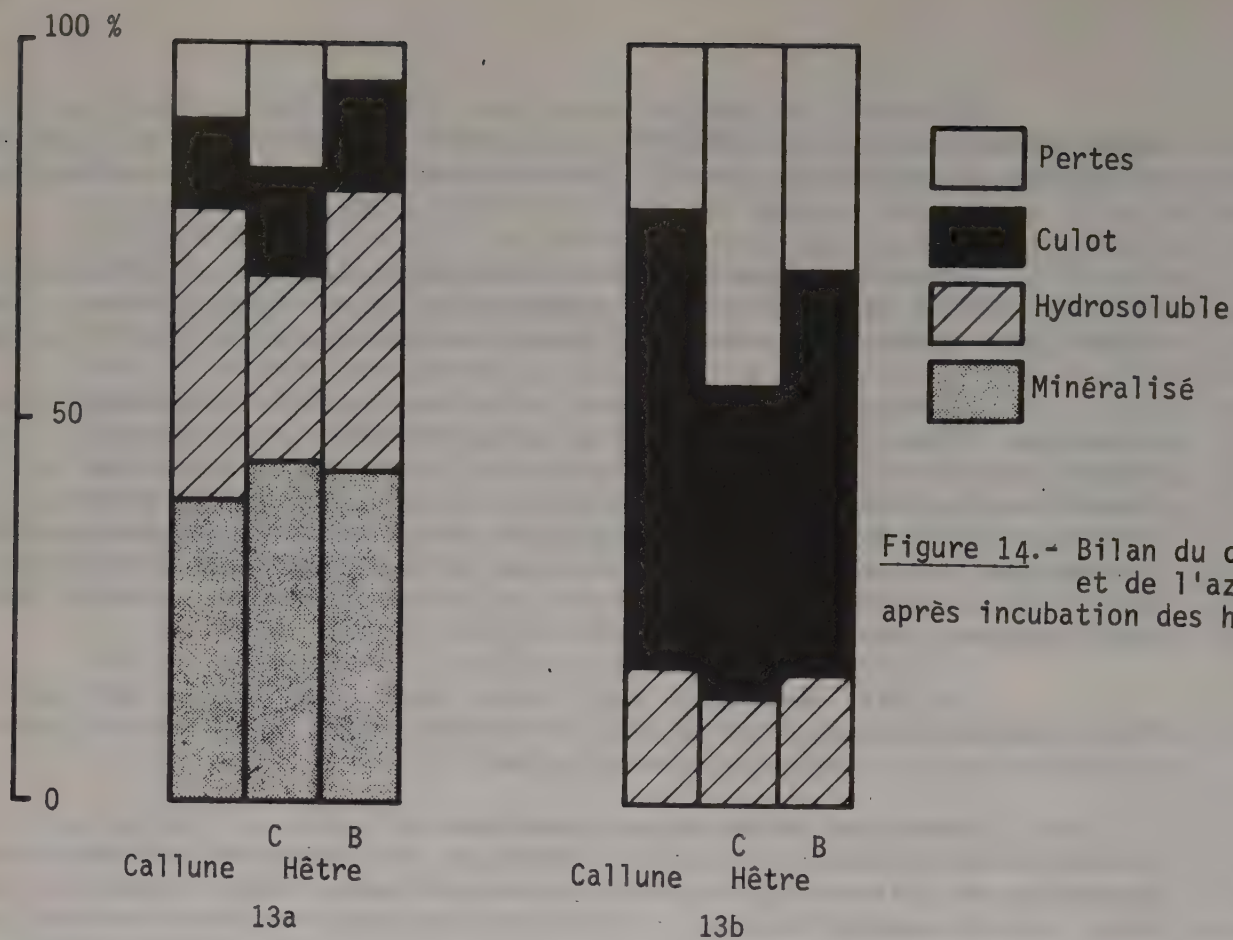
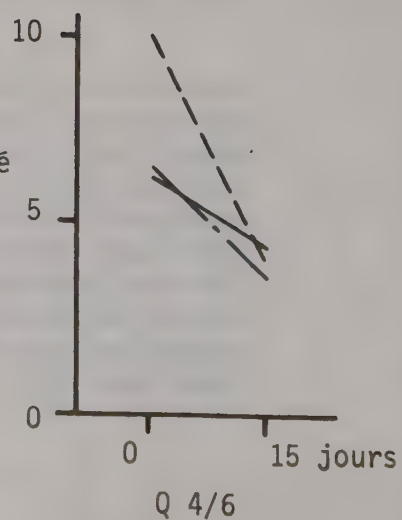


Figure 16.- Evolution de la densité optique au cours de l'incubation



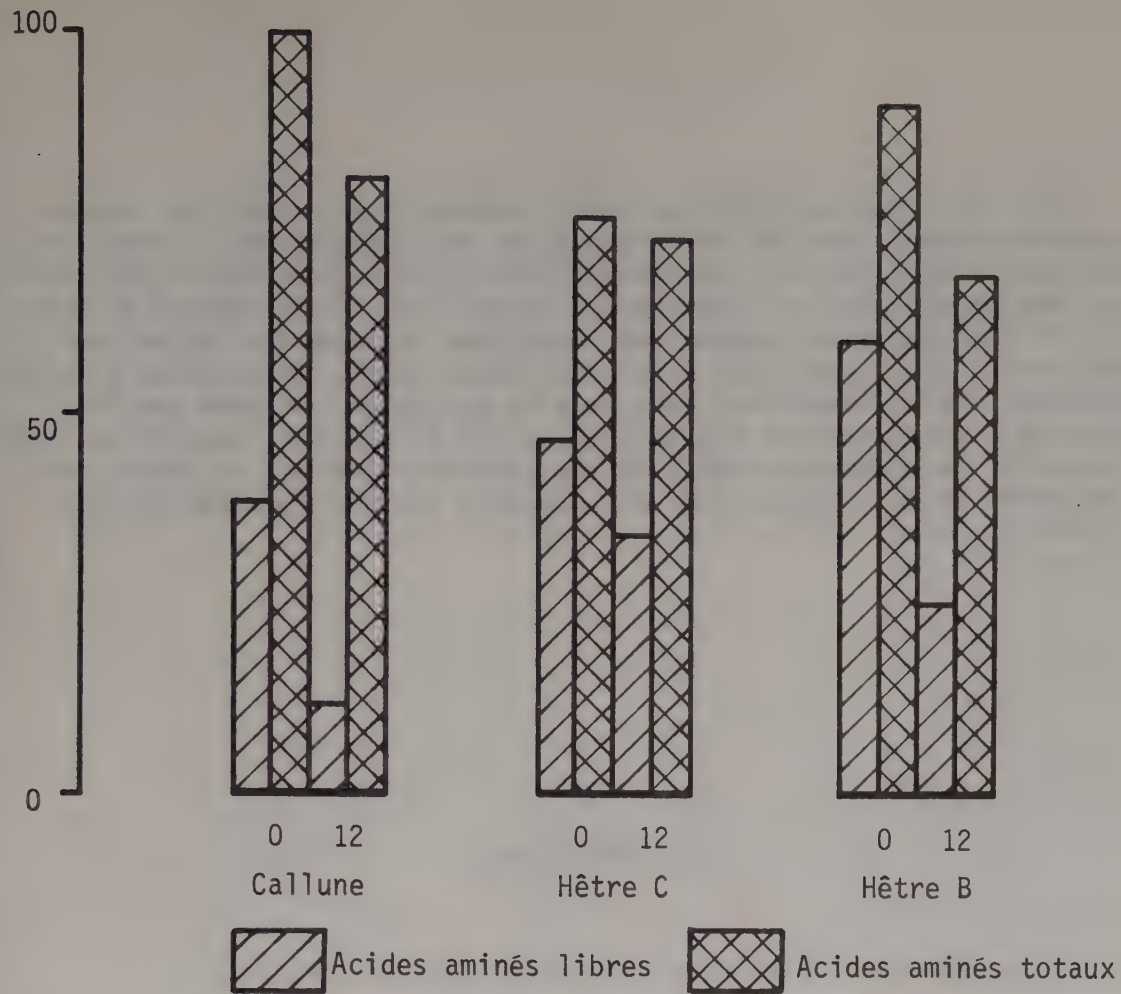


Figure 17.- Répartition de l'azote aminé dans la fraction azotée des hydrosolubles après 0 et 12 jours d'incubation

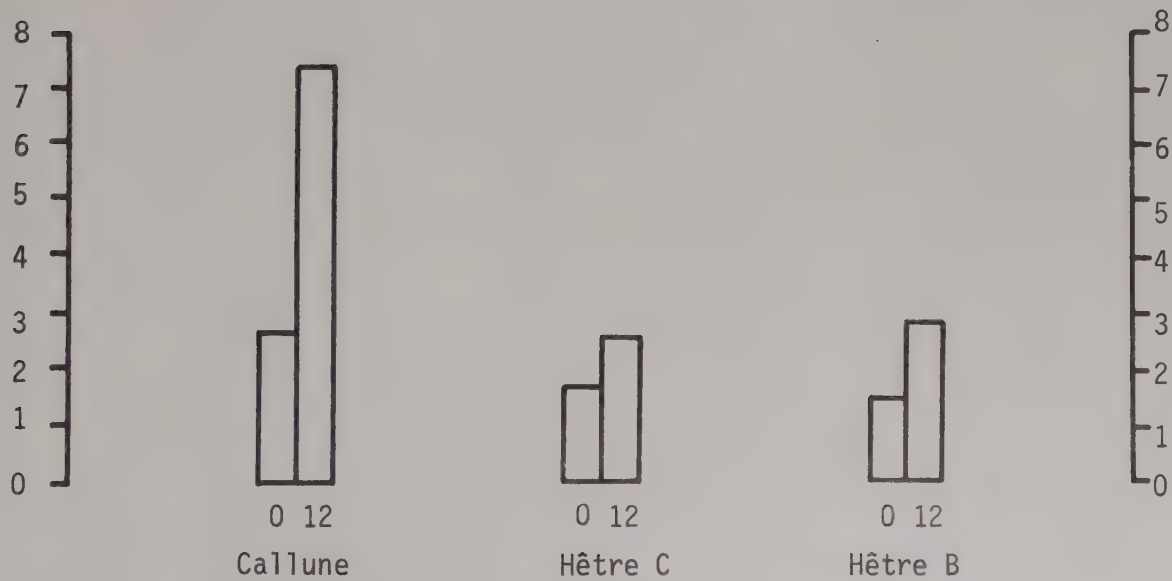


Figure 18.- Nombre d'azotes aminés totaux pour un azote aminé libre, après 0 et 12 jours d'incubation

Les résultats apportés par cette expérience d'incubation donnent des indications surtout globales sur l'évolution des hydrosolubles, sans que, sur le plan biochimique, il soit possible de suivre avec précision l'évolution de telle ou telle catégorie de composés. En outre, même si des phases de submersion du sol se produisent, créant des conditions voisines de celles que nous avons reproduits, elles sont très passagères. Ainsi, pour suivre l'évolution biochimique des hydrosolubles avec plus de précision, et pour que leur humification se déroule dans un milieu plus proche du naturel, nous avons réalisé une nouvelle incubation en utilisant un substrat minéral, et après avoir enrichi les extraits de litières avec des composés radioactifs bien définis utilisés comme traceurs.

QUATRIEME PARTIE

EVOLUTION DES HYDROSOLUBLES
EN PRESENCE DE SOL ET DE TRACEURS RADIOACTIFS

EVOLUTION DES HYDROSOLUBLES
EN PRESENCE DE SOL ET DE TRACEURS RADIOACTIFS

Dans cette étude, nous avons voulu nous rapprocher autant que cela est possible au cours d'une manipulation de laboratoire, des conditions naturelles présidant à l'humification des hydrosolubles. Cette exigence nous a conduit en premier lieu, à remplacer l'incubation en phase liquide, par une nouvelle incubation dans laquelle les hydrosolubles sont mis en présence d'un substratum minéral. Deux caractéristiques physico-chimiques au moins se trouvent ainsi améliorées. D'une part, ce "sol" étant humidifié à sa capacité au champ, nous sommes dans une ambiance oxydante ; la présence d'argile et de certains cations, notamment le fer (SOUCHIER, 1971), permet une évolution physico-chimique des hydrosolubles, donc la formation d'humine d'insolubilisation, à côté de l'évolution strictement microbienne que nous avons suivie dans le chapitre précédent.

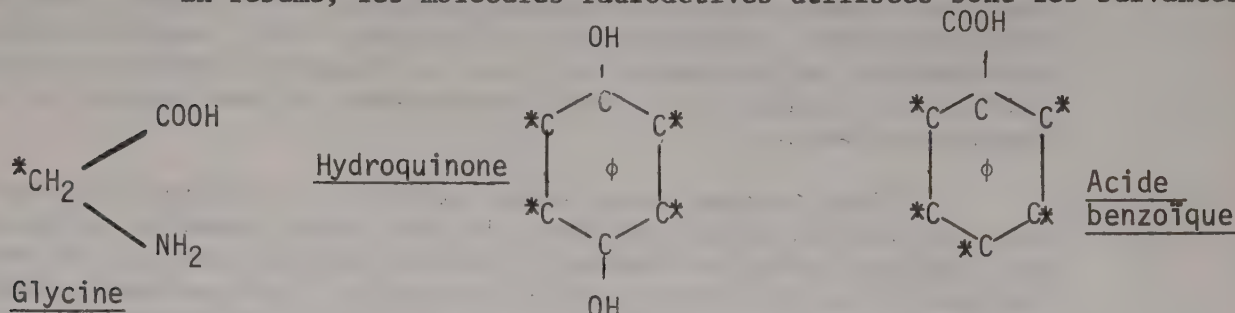
C'est pourquoi nous avons recherché un substratum qui soit riche en fer et en argile, et par ailleurs, le plus pauvre possible en matière organique, afin de limiter au maximum le carbone ne provenant pas des extraits de litières ; nous le verrons, cette condition n'a été que partiellement remplie. Parmi les sols répertoriés au Centre de Pédologie biologique, nous avons retenu l'horizon C du sol brun acide du Haut-Jacques, sur grès intermédiaire, qui nous semblait répondre le mieux à ces impératifs. L'analyse de cet horizon a été présentée dans le premier chapitre, rappelons toutefois pour mémoire, qu'il renferme environ 16 % d'argile et 14 % de fer total.

Au cours des analyses précédentes, nous avons comparé deux stations de Hêtre, celle de la Croisette et celle de Bezange. Les différences observées sont d'ordre quantitatif et ne concernent ni la qualité des produits extraits à partir des litières, ni la dynamique des phénomènes étudiés. Par contre, la comparaison des deux végétaux Hêtre et Callune est plus significative. Ainsi, il nous a paru opportun, à ce point de notre travail, de remplacer l'une des stations de Hêtre (celle de Bezange) par une espèce végétale différente : nous avons choisi la Fétuque, provenant de la même station du Haut-Jacques que le substratum minéral, et qui est une espèce améliorante. Les hydrosolubles extraits à partir de la Fétuque (prélevée comme précédemment en automne) n'ont pas été caractérisés comme ceux des autres végétaux. Cette analyse était à ce niveau d'un intérêt limité : en effet, n'ayant pas été extraits la même année que les hydrosolubles de Hêtre et de Callune, la comparaison des résultats obtenus n'était pas possible ; en outre, dans le présent chapitre, nous nous attachons surtout au comportement des composés radioactifs que nous avons ajoutés aux hydrosolubles.

Certains auteurs (ROGER *et al.*, 1969) ont étudié l'humification de la molécule radioactive de l'acide citrique au cours de l'humification, mais cette molécule était marquée uniquement au niveau de ses groupements fonctionnels. Les carboxyles étant particulièrement labiles, nous avons recherché des molécules marquées sur leurs radicaux, qu'ils soient aromatiques ou aliphatiques.

L'analyse biochimique des extraits de Hêtre et de Callune nous a montré l'importance relative des amino-acides chez le Hêtre, des composés phénoliques chez la Callune. Nous avons donc voulu suivre le comportement pendant l'humification des composés biochimiques ainsi définis. Pour ce qui est des acides aminés, la glycine est l'un des plus simples et il est présent en quantités significatives dans les deux types d'hydrosolubles analysés ; en ce qui concerne les phénols, les dihydroxylés ont paru avoir un rôle particulier, et parmi eux l'hydroquinone. Nous voulions également suivre l'évolution d'un acide phénol et le seul que nous ayons trouvé, marqué sur son cycle, est l'acide benzoïque : nous avons ainsi pu étudier l'influence des groupements fonctionnels présents sur l'évolution d'un cycle aromatique.

En résumé, les molécules radioactives utilisées sont les suivantes :



I.- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Pour indure les molécules marquées aux hydrosolubles, nous les avons diluées avec de la glycine, de l'hydroquinone ou de l'acide benzoïque non marqués, que nous avons ajoutés à raison de 5 % du carbone de chaque hydrosoluble. Finalement, le ^{14}C est tout à fait négligeable, sur le plan quantitatif, par rapport au ^{12}C (CHONE *et al.*, 1973). Nous obtenons ainsi des "solutions mères" d'hydrosolubles enrichis par tel ou tel composé marqué. La radioactivité varie légèrement d'une solution mère à une autre, comme nous le voyons ci-dessous (tableau 32).

Tableau 32.- Radioactivité totale introduite dans chaque solution mère, en désintégrations par minute (d.p.m.)

Molécule marquée	Hydrosoluble	d.p.m. introduites
Acide benzoïque	Callune	17 910 720
	Hêtre	18 900 936
	Fétuque	18 266 580
Hydroquinone	Callune	22 802 148
	Hêtre	21 989 592
	Fétuque	24 005 304
Glycine	Callune	22 133 628
	Hêtre	22 025 700
	Fétuque	21 950 208

L'horizon C prélevé a été séché à 40°C et tamisé à 2 mm. Le tamisage permet d'homogénéiser le prélèvement et de travailler sur des échantillons comparables. Le séchage diminue l'humidité du sol et permet donc d'ajouter une plus grande quantité d'hydrosolubles, et par là, de composés carbonés frais, avant d'atteindre la capacité au champ. Pour chaque échantillon mis à incuber, nous avons utilisé 100 g de substratum sec, réhumidifié avec 36 ml d'hydrosolubles.

Les hydrosolubles extraits à partir des litières pour cette expérience, étaient beaucoup moins riches en carbone que ceux utilisés pour les analyses précédentes. Nous avons été obligés de les concentrer sous pression réduite. Les taux de carbone obtenus après concentration sont rapportés dans le tableau 33.

Tableau 33.- Carbone apporté par les hydrosolubles

Hydrosoluble	C mg/ml	C après concentration mg/ml	C apporté (mg) par échantillon
Callune	0,125	1,56	54
Hêtre	0,230	2,09	72
Fétuque	0,072	1,71	59

Au cours de l'étude de la respirométrie, outre le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$, nous avons suivi le dégagement total de CO_2 dans chaque cas, ainsi que celui qui a lieu lorsque les hydrosolubles sont apportés sans enrichissement préalable.

Pour cela, à côté des solutions mères radioactives, nous avons fait incuber dans des conditions identiques, d'une part des hydrosolubles enrichis par de la glycine, de l'hydroquinone ou de l'acide benzoïque non marqués (enrichissement de 5 % du carbone) et, d'autre part, des hydrosolubles seuls. Ces derniers permettent de connaître l'évolution propre de chaque type de litière, les précédents, par comparaison, indiquent l'influence globale des composés ajoutés.

Au terme de l'incubation, nous avons suivi l'humification des composés carbonés, et principalement du ^{14}C , en pratiquant une extraction et un fractionnement de la matière organique.

II.- BILAN DU CARBONE AU TERME DE L'INCUBATION

Avant d'aborder le détail du déroulement de l'humification par l'analyse des différentes fractions obtenues, il est intéressant de comparer globalement, dans chacun des cas envisagés, la fraction de carbone humifiée, celle qui est incorporée au substratum minéral, à la partie ayant subi une minéralisation, et qui a ainsi pu quitter le milieu initial.

Le bilan du carbone total au terme de l'incubation de 3 semaines ne permet pas de déceler des variations significatives d'un hydrosoluble à l'autre. Il faut pour cela procéder à une expérience de plus longue durée, comme celle qu'a faite GALLARDO (1974) dans laquelle une période de dessiccation de 21 jours sépare deux incubations de même durée. Et encore, si l'on envisage qu'un seul substratum minéral, comme c'est le cas ici, ne peut-on déceler qu'un certain

nombre de tendances globales des processus d'humification, sans pouvoir préciser le rôle de telle ou telle catégorie de composés. Dans l'ensemble, la minéralisation est plus faible avec les espèces acidifiantes, surtout lors de la seconde incubation ; dans ce cas, les composés humiques obtenus sont plus abondants et surtout plus stables.

L'utilisation de molécules radioactives permet une analyse plus précise de l'influence et du devenir des molécules apportées. Ainsi, il apparaît (tableau 33bis) que l'hydroquinone a un comportement radicalement différent de celui des autres produits utilisés :

Tableau 33bis : Rapport ^{14}C minéralisé/ ^{14}C humifié

	Glycine	Hydroquinone	Acide benzoïque
Callune	1,70	0,04	3,55
Hêtre	1,70	0,07	2,70
Fétuque	1,33	0,14	2,33

Des trois molécules envisagées ici, c'est celle d'acide benzoïque qui est la moins humifiée, et celle d'hydroquinone qui l'est le plus, de très loin. Ainsi, bien que présentant tous les deux un caractère aromatique, ces deux composés ont une évolution et même une influence différente puisque, nous le verrons, l'hydroquinone a un effet inhibiteur marqué vis-à-vis de la minéralisation ; inversement, l'acide benzoïque a un comportement plus comparable à celui de l'acide aminé, la glycine.

Nous apercevons ainsi déjà à ce stade l'importance des composés aromatiques présents dans un hydrosoluble de litière, et surtout le rôle différent dans l'humification que peuvent jouer les uns ou les autres selon leur nature, selon les groupements fonctionnels qu'ils peuvent porter.

III.- RESPIROMETRIE : CO_2 et $^{14}\text{CO}_2$ DEGAGES

Les quantités de carbone dégagées sous forme de CO_2 sont mesurées soit en valeur absolue (exprimée en mg), soit en valeur relative, calculée en fonction du carbone introduit. Il est certain que cette détermination n'est pas strictement exacte lorsqu'elle concerne le carbone total dégagé. En effet, si l'on est sûr que le ^{14}C minéralisé provient exclusivement des hydrosolubles, le ^{12}C peut en partie être dû à la matière organique présente dans l'horizon C utilisé comme substratum minéral.

Par ailleurs, dans le cas présent, l'utilisation d'un témoin constitué par le sol humidifié avec de l'eau (respiration endogène) ne s'avère guère utile. D'une part, le "priming effect" dû à l'apport d'hydrosolubles varie d'un

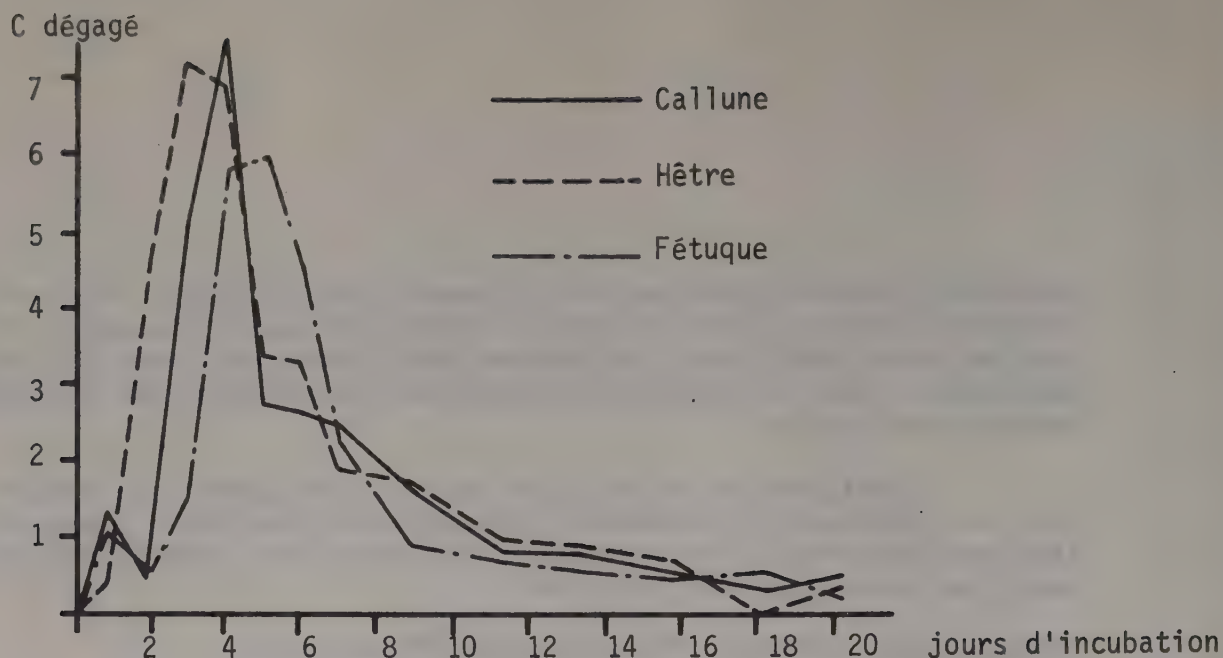


Figure 19.- Dégagement quotidien de C sous forme de CO₂ (% du C ajouté)

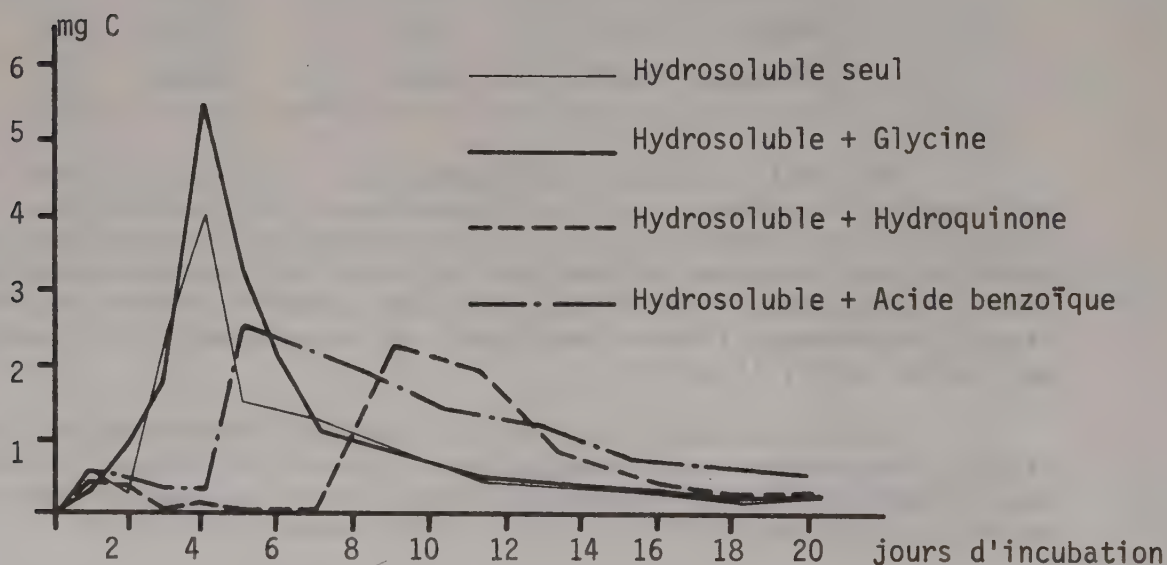


Figure 20.- Dégagement quotidien de C total avec l'hydrosoluble de Callune

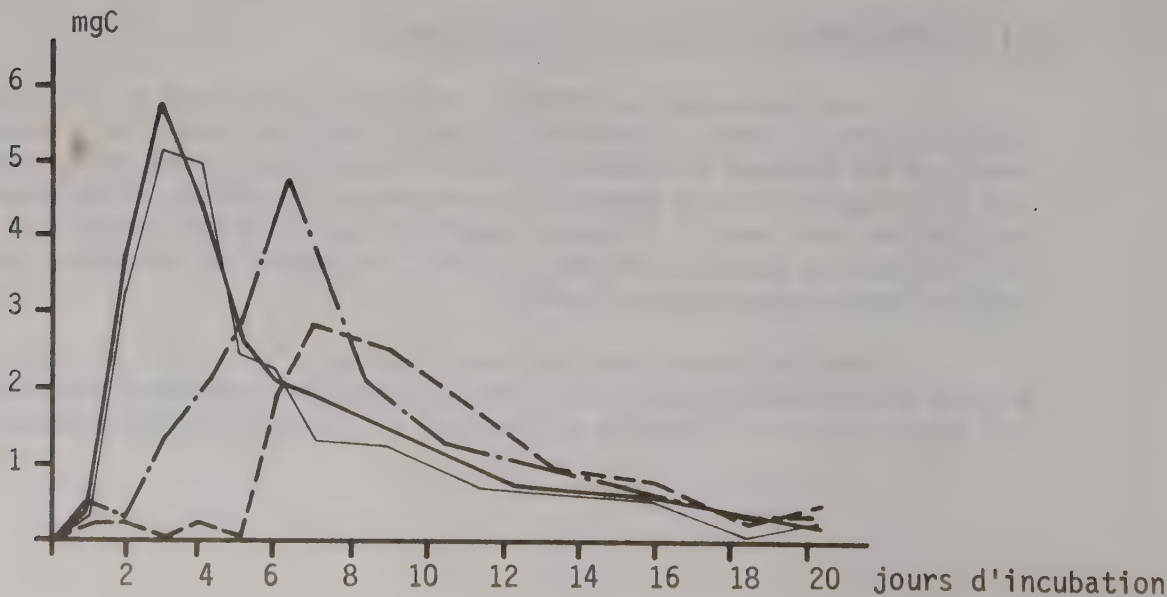


Figure 21.- Dégagement quotidien du C total avec l'hydrosoluble de Hêtre

cas à l'autre et rend peu rigoureuse la valeur de cette respiration endogène ; d'autre part, nous nous intéressons ici, plus à l'évolution des molécules marquées qu'à celle des hydrosolubles eux-mêmes, cet aspect ayant été abordé plus en détail par ailleurs (GALLARDO, 1974)

1.- Minéralisation des hydrosolubles seuls

Ce sont donc ces respirométries qui nous serviront de référence pour analyser dans chaque cas l'influence des molécules ajoutées sur la minéralisation globale. Nous voyons que globalement, le Hêtre a une minéralisation nettement plus importante que les deux autres extraits de litières (tableau 34).

Tableau 34.- Carbone minéralisé en 21 jours d'incubation (en % du carbone ajouté)

Hydrosoluble	C total minéralisé
Callune	33,9
Hêtre	39,9
Fétuque	31,3

D'une façon générale, les courbes de dégagement quotidien ont la même allure dans les trois cas (Figure 19). Pour la Callune et la Fétuque, nous observons un léger ralentissement le deuxième jour, puis une reprise normale de la minéralisation ; avec le Hêtre, le démarrage est plus lent le premier jour, mais l'activité microbienne augmente régulièrement les jours suivants. Les maxima ont lieu entre le troisième et le cinquième jour et nous constatons le même classement que pour le carbone total minéralisé : d'abord le Hêtre, puis la Callune, et enfin la Fétuque. Cette minéralisation se fait rapidement, puisqu'en une dizaine de jours (la moitié de la durée de l'incubation), les 3/4 du carbone minéralisé sont déjà dégagés.

Il semble paradoxal que la Fétuque ait le dégagement le plus faible ; le contraire aurait paru plus naturel. En fait, nous avons constaté à la fin de l'incubation un certain développement mycélien dans les échantillons, plus abondant avec la Fétuque qu'avec le Hêtre, inexistant avec l'hydrosoluble de Callune. Le carbone nécessaire à l'édification de ces colonies ne peut avoir pour origine que les hydrosolubles, ou, pour une petite part, le "sol" utilisé ; il paraît alors vraisemblable que ce développement se soit fait aux dépens du carbone minéralisé, partiellement tout au moins.

2.- Minéralisation des hydrosolubles enrichis en glycine

Nous constatons que dans tous les cas, la cinétique de la minéralisation globale est exactement la même, avec ou sans enrichissement préalable en glycine (Figures 20, 21, 22). La glycine n'induit donc aucune variation concernant le déroulement de la minéralisation, elle intervient uniquement sur son intensité.

En effet, avec les trois hydrosolubles utilisés, le maximum de dégagement de CO₂ enregistré après adjonction de la glycine est plus important que celui observé pour l'hydrosoluble seul. Cette augmentation se retrouve également au niveau de la quantité globale minéralisée (Tableau 35).

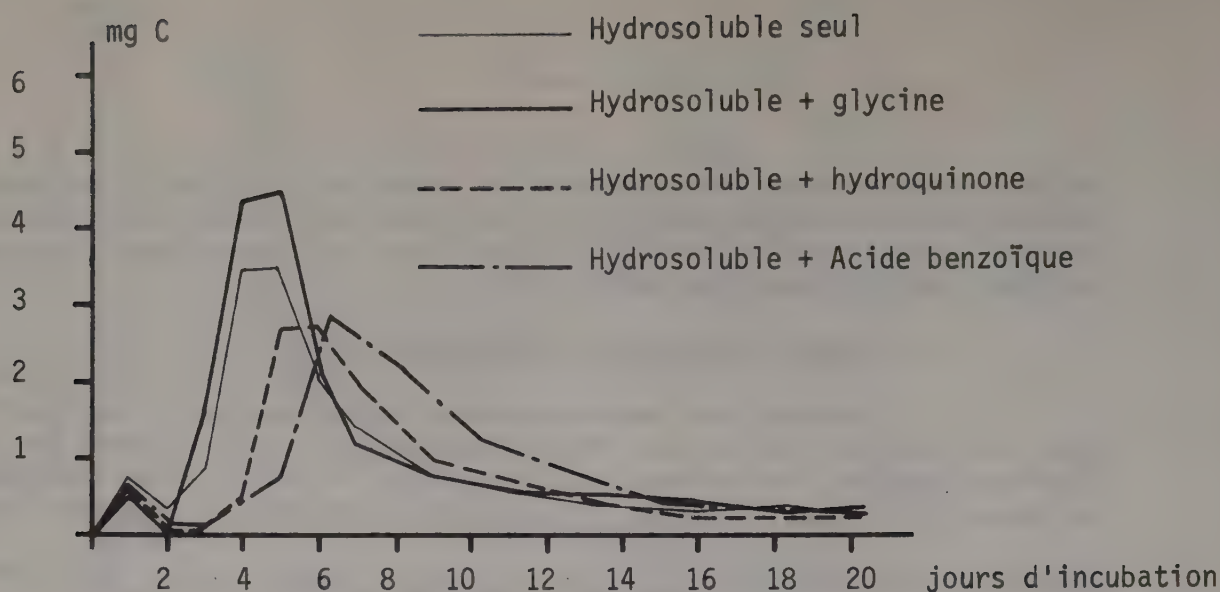


Figure 22.- Dégagement quotidien du C total avec l'hydrosoluble de Fétuque

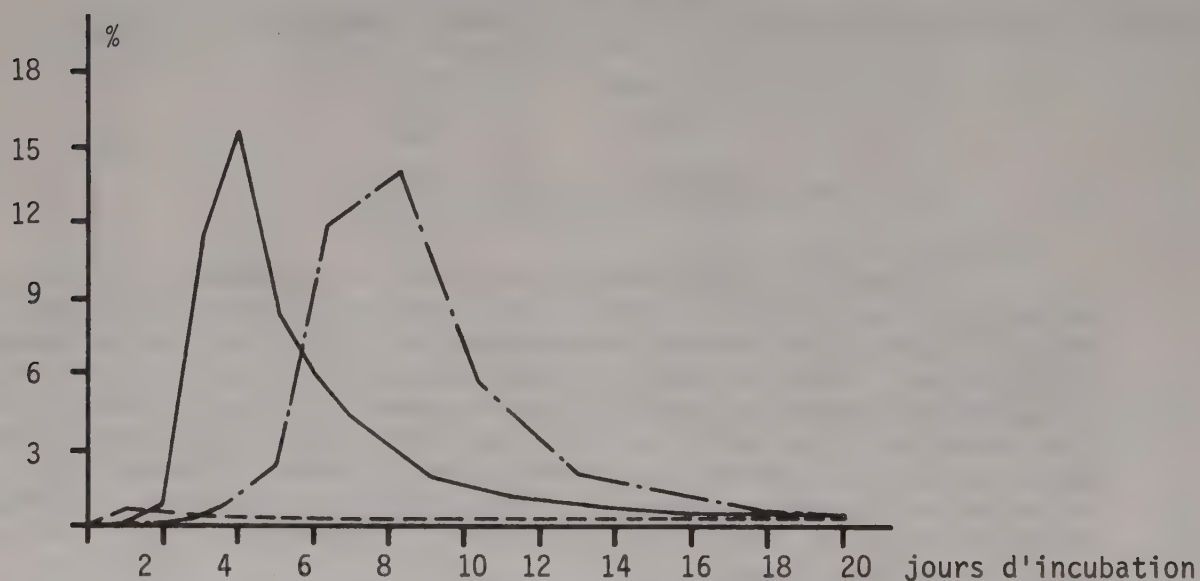


Figure 23.- Dégagement quotidien de ^{14}C avec l'hydrosoluble de Callune (en % de la radioactivité introduite)

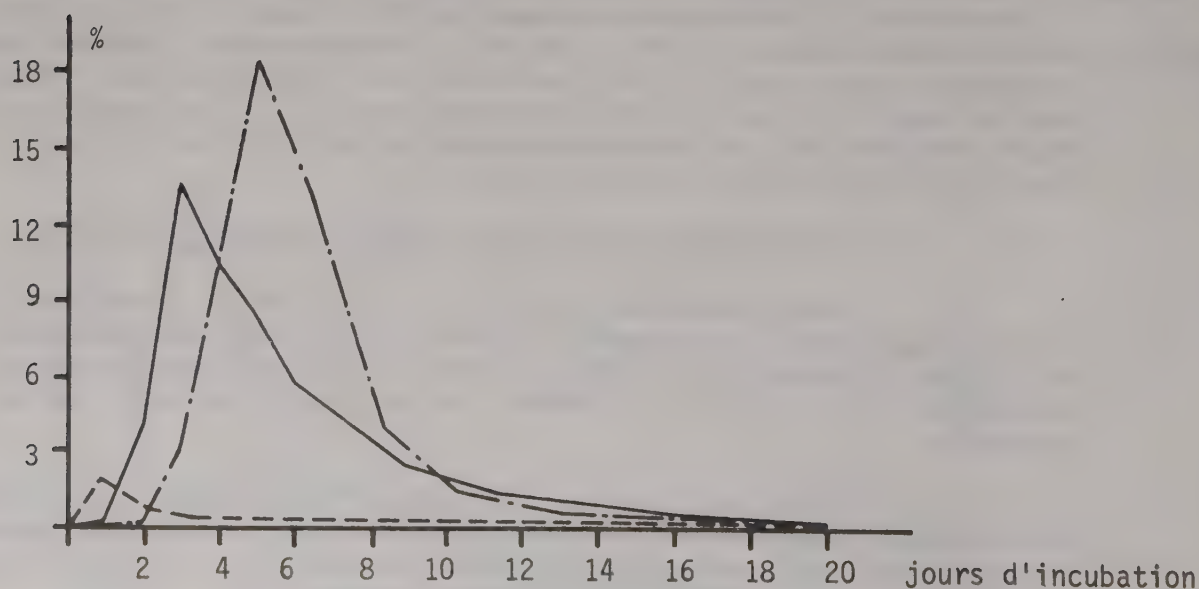


Figure 24.- Dégagement quotidien de ^{14}C avec l'hydrosoluble de Hêtre (en % de la radioactivité introduite).

Tableau 35.- Variation du taux due à la glycine

Hydrosoluble	Carbone minéralisé	Variation par rapport à l'hydrosoluble seul
Callune	36,5	+ 7,7 %
Hêtre	42,5	+ 6,5 %
Fétuque	36,0	+ 15,0 %

Cet accroissement est supérieur aux 5 % de carbone supplémentaires apportés par la glycine ; celle-ci provoque donc une certaine stimulation de la minéralisation, importante surtout dans le cas de la Fétuque. Nous avons vu qu'avec la Fétuque, le développement de moisissures limitait la minéralisation globale de l'hydrosoluble ; il est probable que l'apport de glycine atténue l'effet de cet antagonisme et permette à la minéralisation de reprendre son importance. Les colonies mycéliennes ne sont pas plus développées après adjonction de l'acide aminé.

Nous voyons donc que l'influence d'un acide aminé sur la minéralisation d'extraits hydrosolubles de litières ne concerne pas l'évolution du dégagement gazeux, mais son intensité : il a un effet stimulant.

3.- Minéralisation des hydrosolubles enrichis en composés phénoliques

Un point commun rapproche l'hydroquinone et l'acide benzoïque pour les opposer nettement à la glycine : ils provoquent une inhibition de la minéralisation. En effet, l'activité microbienne est dans les deux cas, profondément perturbée : le dégagement gazeux est faible, ou nul, pendant plusieurs jours, au début de l'incubation, et les maxima sont atteints après ceux de l'hydrosoluble seul.

Cependant, si ces deux composés phénoliques ont un comportement analogue vis-à-vis de la cinétique du dégagement de CO₂, il n'en est pas de même pour son intensité.

a.- Hydroquinone

Le retard provoqué par l'hydroquinone est variable selon les hydrosolubles : le maximum a lieu le neuvième jour pour la Callune, le septième pour le Hêtre et le cinquième pour la Fétuque. Pour le moment, nous ne pouvons que constater que nous retrouvons l'influence des espèces végétales (acidifiante, mixte ou améliorante) ; nous verrons en suivant l'évolution de la molécule d'hydroquinone elle-même (minéralisation de ¹⁴CO₂), s'il est possible de mieux comprendre cette cinétique.

L'hydroquinone retarde la minéralisation, elle diminue également son intensité (tableau 36).

Cet effet toxique de l'hydroquinone est important, puisque 1/6 à 1/4 de la minéralisation n'a pas lieu, et il est nettement plus sensible, comparativement, que l'effet stimulant de la glycine.

Tableau 36.- Variation de taux de minéralisation due à l'hydroquinone

Hydrosoluble	Carbone minéralisé	Variation par rapport à l'hydrosoluble seul
Callune	27,6	- 18,6 %
Hêtre	29,2	- 26,8 %
Fétuque	26,1	- 16,6 %

b.- Acide benzoïque

En fonction des hydrosolubles, l'acide benzoïque a une influence pratiquement inverse de celle de l'hydroquinone sur la cinétique de l'activité microbienne : l'hydrosoluble où l'inhibition due à l'hydroquinone est la plus forte, est celui qui est le moins sensible à l'effet toxique de l'acide benzoïque (Callune). Pour les deux extraits de Hêtre et de Fétuque, le maximum de dégagement a lieu le sixième jour avec l'acide benzoïque, mais il se produit légèrement plus tôt qu'en présence d'hydroquinone avec le Hêtre, et plus tard avec la Fétuque.

Pour ce qui est de la variation du taux de minéralisation, l'influence de l'acide benzoïque dépend du végétal (Tableau 37).

Tableau 37.- Variation du taux de minéralisation due à l'acide benzoïque

Hydrosoluble	Carbone minéralisé	Variation par rapport à l'hydrosoluble seul
Callune	40,3	+ 18,9 %
Hêtre	38,9	- 2,5 %
Fétuque	29,7	- 5,1 %

Nous ne retrouvons plus ici l'effet toxique manifesté par l'hydroquinone. En effet, avec les deux extraits de Hêtre et de Fétuque apparaît un léger effet dépressif, mais qui n'a rien de comparable à celui que nous observions ci-dessus ; avec la Callune, au contraire, l'acide benzoïque provoque une stimulation de la minéralisation plus importante, même, que celle due à la glycine.

L'acide benzoïque est un bon substrat pour certaines bactéries fixatrices d'azote, notamment les *Azotobacter* (VOETS, 1958). Il pourrait ainsi être possible que les extraits de Callune, pauvres en azote, contiennent plus de fixateurs d'azote que les autres ; le développement de ces fixateurs serait stimulé par l'acide benzoïque, d'où l'effet positif de celui-ci sur la minéralisation des hydrosolubles de Callune.

La comparaison des influences de l'hydroquinone et de l'acide benzoïque sur la minéralisation des hydrosolubles montre bien un certain effet toxique des composés phénoliques : dans tous les cas, le démarrage de l'activité microbienne est retardé. Cependant, selon la structure des molécules, l'inhibition de début d'incubation peut être modulée, voire inversée dans certains cas, puisque l'hydroquinone a un effet dépressif très marqué, alors que l'acide benzoïque ajouté à l'extrait de Callune stimule finalement la minéralisation.

4.- Minéralisation de la molécule de glycine

La minéralisation des molécules ajoutées est décelée par l'analyse du dégagement de $^{14}\text{CO}_2$: seules ces molécules étant marquées, le ^{14}C n'a qu'une seule origine possible.

Une fois encore, avec la glycine, nous constatons une identité totale dans la cinétique des minéralisations : que ce soit l'hydrosoluble seul, enrichi en glycine, ou l'évolution propre de celle-ci, pour un hydrosoluble donné, le développement de la minéralisation ne varie pas. (Figures 23, 24, 25).

Il apparaît donc bien que la glycine n'a pas une influence qualitative sur la minéralisation, mais uniquement quantitative. Quantitativement, nous constatons qu'une fraction importante de la glycine introduite est minéralisée (Tableau 38).

Tableau 38.- Minéralisation de la glycine.

Hydrosoluble	% de la radioactivité retrouvée dans le $^{14}\text{CO}_2$
Callune	63
Hêtre	63
Fétuque	57

Nous voyons qu'une forte quantité (plus de la moitié) du ^{14}C introduit avec la glycine est dégagée sous forme de $^{14}\text{CO}_2$. Cela signifie donc que 60 % environ des molécules de glycine introduites sont détruites par la microflore ; seuls les 40 % restant pourront participer à l'humification. Notons que nous ne pouvons suivre ici que le radical carboné aliphatique de l'acide aminé qui nous intéresse. Nous ne pouvons, avec la technique employée, avoir une idée précise du devenir du groupement azoté de ce composé.

5.- Minéralisation de la molécule d'hydroquinone

Dans ce cas, il n'y a plus aucune similitude entre les diverses minéralisations analysées, même pas entre celle de l'hydroquinone seule et le dégagement global produit par l'hydrosoluble enrichi.

La faible proportion d'hydroquinone qui est minéralisée, l'est en majeure partie le premier jour de l'incubation et cette molécule semble protégée par la suite, même lorsque s'amorce la minéralisation globale. De ce fait, le pourcentage de ^{14}C qui est dégagé est faible (Tableau 39).

Tableau 39.- Minéralisation de l'hydroquinone

Hydrosoluble	% de la radioactivité retrouvée dans le $^{14}\text{CO}_2$
Callune	4
Hêtre	7
Fétuque	12

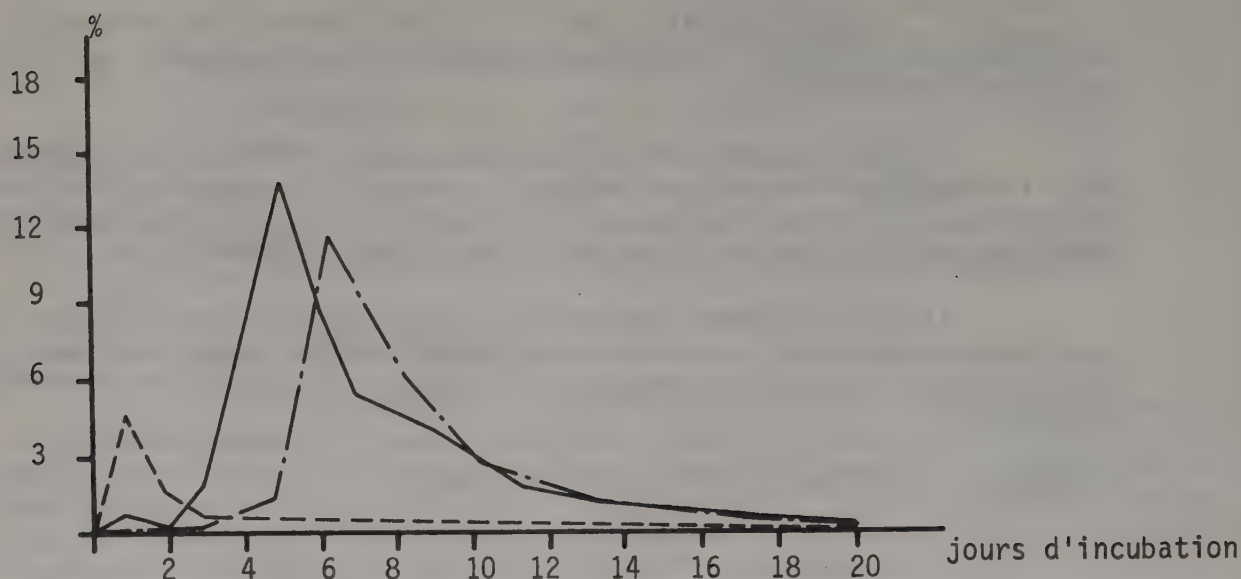


Figure 25.- Dégagement quotidien de ^{14}C avec l'hydrosoluble de Fétuque
C % de la radioactivité introduite

Il semble par ailleurs, qu'il existe un rapport entre la minéralisation de l'hydroquinone et le démarrage de la minéralisation globale des échantillons enrichis correspondants. En effet, plus la minéralisation de cette molécule est importante, plus le départ de la minéralisation globale est rapide. Ainsi, avec la Fétuque, cas où la minéralisation de l'hydroquinone est la plus forte, le dégagement global de CO_2 est à son maximum dès le cinquième jour de l'incubation. Avec la Callune, par contre, l'hydroquinone est peu attaquée, et le maximum n'est atteint que le neuvième jour.

En outre, nous constatons que si plus de la moitié du dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ a eu lieu au moment où la minéralisation globale devient importante, la quantité effectivement minéralisée varie selon les cas. Ainsi, la disparition de l'effet toxique de l'hydroquinone permet la minéralisation des hydrosolubles. Cette disparition se fait par minéralisation de l'hydroquinone (il y a donc rupture de son cycle) sous l'influence de quelques souches microbiennes particulières ; cependant, la comparaison du comportement des extraits de Callune, de Hêtre et de Fétuque laisse supposer l'intervention d'autres phénomènes préservant la microflore des causes de cette inhibition. Ces processus différents pourraient être une adsorption des molécules d'hydroquinone sur des argiles ou une polymérisation de ces molécules entre elles, ou avec d'autres édifices biochimiques.

6.- Minéralisation de la molécule d'acide benzoïque

L'acide benzoïque n'a pas un comportement analogue à celui de l'hydroquinone ; en effet, il n'est pas nécessaire qu'il soit minéralisé pour que débute la minéralisation globale puisque sa minéralisation propre commence au même moment que celle des hydrosolubles enrichis, ou légèrement plus tard pour le cas de la Callune.

Il apparaît ainsi que l'effet toxique de l'acide benzoïque existe puisqu'il induit un certain retard dans le démarrage de la minéralisation, mais qu'il peut être levé plus facilement que celui de l'hydroquinone puisque les deux minéralisations (^{12}C et ^{14}C) ont lieu simultanément. L'action antibiotique de l'acide benzoïque serait donc moins puissante que celle de l'hydroquinone.

Malgré un départ plus lent, la minéralisation de l'acide benzoïque est très importante, plus encore que celle de la glycine (Tableau 40). Son cycle aromatique est donc largement détruit.

Tableau 40.- Minéralisation de l'acide benzoïque

Hydrosoluble	% de la radioactivité retrouvée dans le $^{14}\text{CO}_2$
Callune	78
Hêtre	73
Fétuque	70

7.- Discussion

Les résultats obtenus permettent de comparer soit l'évolution d'un hydrosoluble donné en présence de chacun des trois composés ajoutés, soit celle d'une molécule ayant servi à l'enrichissement avec les trois hydrosolubles utilisés.

Le deuxième type de comparaison ne donne pas beaucoup de résultats ; il s'avère donc qu'un produit ajouté en excès, comme nous l'avons fait ici, se comporte de façon sensiblement analogue quel que soit l'extrait de litière avec lequel il est mis à incuber. Nous nous rendons ainsi compte, a posteriori, qu'un tel traitement permet de s'affranchir de la variable "hydrosoluble" pour ne plus étudier que les transformations subies par les traceurs apportés.

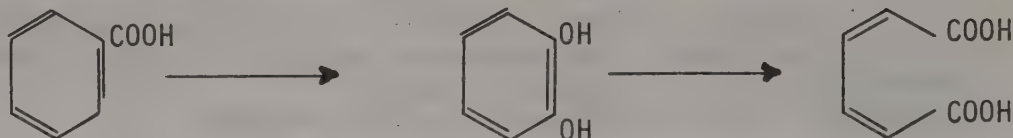
L'hydroquinone et l'acide benzoïque sont constitués chacun par un cycle aromatique auquel sont liés soit deux groupements "OH" (hydroquinone), soit un groupement "COOH" (acide benzoïque). D'après ROGER *et al.*, (1969) les carboxyles sont rapidement minéralisés lors d'une incubation ; les différences dans le comportement physico-chimique de ces deux molécules seront dues en grande partie aux hydroxyles.

La présence de deux groupements hydroxyles sur le cycle de l'hydroquinone le préserve de la minéralisation, puisque seulement 4 à 12 % des atomes de ^{14}C introduits avec cette molécule sont dégagés sous forme de $^{14}\text{CO}_2$, alors que 70 à 78 % des atomes marqués de l'acide benzoïque subissent cette évolution.

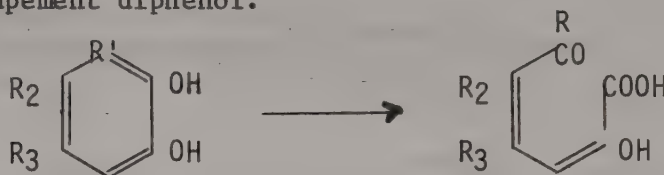
Cela nous montre que le cycle aromatique en lui-même peut facilement être minéralisé et que ce n'est pas à sa structure aromatique propre, plus résistante, qu'il doit sa protection, mais bien aux groupements fonctionnels qu'il porte.

Des études portant sur la dégradation des composés aromatiques par des bactéries aérobies (RIBBONS, 1966) ont montré que beaucoup de ces substrats sont métabolisés après transformation en di-phénols, en catéchol particulièrement. Ces intermédiaires sont ensuite convertis en composés aliphatiques lors de la rupture du cycle par oxydation. Deux voies d'évolution ont été découvertes dans les bactéries.

Rupture "ortho" : fission oxydante de la liaison unissant les deux atomes de carbone portant les hydroxyles.



Rupture "méta" : ouverture du cycle aromatique au niveau de la liaison C-C adjacente au groupement diphéno.



Des métabolismes complètement différents résultent de ces deux modes d'ouverture du cycle aromatique.

Nous voyons par là que si l'action microbienne est la seule à se faire sentir, les cycles porteurs d'hydroxyles ne sont pas plus protégés que les autres, au contraire. En effet, nous avons constaté une certaine minéralisation de l'hydroquinone le premier jour de l'incubation, plus importante que celle subie par l'acide benzoïque. Or, il apparaît finalement que, au niveau d'un sol, ces composés diphénoles sont stables ; ils sont donc masqués et ainsi soustraits à l'action de la destruction biologique.

Ainsi, les groupements "OH" interviennent en permettant aux molécules dans lesquelles ils se trouvent de ne pas rester à l'état libre, mais de participer à la formation de composés plus complexes sur lesquels l'action des microorganismes sera beaucoup plus limitée. Le rôle de ces groupements fonctionnels serait donc d'ordre physico-chimique, en favorisant une adsorption à la surface des colloïdes minéraux, ou d'ordre biochimique, en permettant des liaisons entre différents composés organiques présents, et la condensation de ces produits. La grande différence observée entre le comportement de l'hydroquinone et celui de l'acide benzoïque montre une opposition entre la biodégradation des molécules et leur incorporation au sol sous des formes variées ; l'une ou l'autre de ces tendances l'emportera et cela est directement lié à la présence d'hydroxyles sur les cycles aromatiques.

La glycine, à cause de son groupement aminé est très vulnérable et rapidement dégradée par les microorganismes. Elle pourrait également leur être soustraite par un processus analogue à celui de l'hydroquinone, car les réactions entre amino-acides et composés phénoliques sont importantes (HAIDER et al., 1965), mais elles ne deviennent faciles que pour des pH supérieurs à 6-6,5. Dans les conditions qui président à l'incubation (pH de l'ordre de 4,5 à 5) de telles réactions existent, mais sont forcément limitées, et la minéralisation de la glycine peut être importante.

IV.- HUMIFICATION

Pour étudier l'humification qui a lieu pendant l'incubation, nous avons pratiqué à la fin de celle-ci une extraction et un fractionnement de la matière organique présente dans les échantillons. Nous avons ainsi pu séparer plusieurs fractions : les hydrosolubles, les composés solubles dans un mélange pyrophosphate de sodium - soude, divisés en acides fulviques (solubles à pH 1) et les acides humiques (précipitent à pH 1), les composés extractibles ensuite par NaOH N/10, enfin, les composés inextractibles après ces traitements, ou humine.

1.- Humification des extraits de litières seuls

Après une seule incubation de 21 jours, il n'est pas possible d'apprécier avec précision, l'humification des extraits de litières. En effet, étant limité par la concentration en carbone de ces derniers, et par la capacité au champ du substratum utilisé, nous n'avons pas pu apporter une quantité suffisamment importante de carbone. Dans ces conditions, le stock de carbone initialement présent dans le substratum nous cache en partie les variations dues aux hydrosolubles apportés.

En l'absence de litières uniformément marquées, il était nécessaire de prolonger l'incubation pour accentuer les différences entre les divers traitements. C'est ce qu'a fait GALLARDO (1974), qui a utilisé les mêmes matériaux que nous, et les a fait évoluer au cours de deux séries d'incubation de 21 jours chacune séparées par une période de dessiccation de 21 jours également.

La Fétuque et le Hêtre ont une minéralisation assez importante au cours de la deuxième incubation, et sont à l'origine de composés humifiés relativement labiles. Avec la Callune, par contre, cette minéralisation secondaire est très faible, et l'humine formée est beaucoup plus stable.

2.- Humification des extraits enrichis

De même que pour l'humification des extraits seuls, dans le cas de l'incubation avec des hydrosolubles enrichis, les variations du carbone total contenu dans les différentes fractions de matière organique extraite ne permettent pas une analyse fine de l'influence des composés ajoutés sur l'humification des extraits de litières.

La répartition du carbone dans chacune des fractions analysées est indiquée dans le tableau 41 et quelques tendances générales ressortent toutes de ces résultats.

En comparant les différents extraits de litières, nous retrouvons systématiquement moins d'hydrosolubles après l'incubation dans le cas de la Callune, et également moins d'alcalinosolubles. Par contre, l'humine est plus importante avec cette espèce acidifiante qu'avec les deux autres végétaux.

La seule influence régulière des composés ajoutés décelable ici, concerne les produits restant hydrosolubles après l'incubation. Avec les trois extraits de litières, ces hydrosolubles sont les moins abondants dans le cas d'un enrichissement préalable en glycine et les plus importants avec l'hydroquinone. Ceci peut sembler paradoxal, puisque c'est la Callune qui donne le moins de produits hydrosolubles en fin d'incubation et que, par ailleurs, dans cet extrait,

les phénols sont prépondérants par rapport aux amino-acides. En fait, deux phénomènes doivent se combiner : l'humification importante des extraits de Callune, et la stimulation de la minéralisation par la glycine ou son inhibition par l'hydroquinone.

Tableau 41.- Répartition, en pour cent, du carbone total dans les différentes fractions extraites (G = glycine, H = hydroquinone, AB = acide benzoïque)

	CALLUNE			HETRE			FETUQUE		
	G	H	AB	G	H	AB	G	H	AB
Hydrosolubles	0,61	1,48	1,10	1,40	2,73	1,86	1,07	1,32	1,28
Extr. Pyro - soude	37,65	38,33	38,94	40,71	39,39	39,66	39,57	40,86	39,34
dont A.F.	33,18	33,89	34,73	36,07	36,27	35,88	36,78	35,98	35,80
dont A.H.	4,47	4,44	4,20	4,64	3,12	3,78	2,79	4,88	3,54
Extr. Soude	3,87	3,36	3,79	4,13	3,48	3,20	3,89	3,29	3,14
Humine	57,82	56,82	56,17	53,75	54,39	55,28	54,47	54,53	56,27

3.- Humification des molécules marquées

a.- Comparaison humification-minéralisation

Nous avons prélevé une quote-part des solutions extraites dont nous avons dosé le carbone total, pour en mesurer la radioactivité. L'origine du carbone analyse par cette méthode n'est plus ambiguë comme dans le cas précédent ; nous pouvons donc suivre avec précision l'évolution des molécules marquées apportées.

Tableau 42.- Répartition du ¹⁴C non minéralisé après l'incubation, en pour cent de la radioactivité présente (G = glycine, H = hydroquinone, AB = acide benzoïque).

	CALLUNE			HETRE			FETUQUE		
	G	H	AB	G	H	AB	G	H	AB
Hydrosolubles	1,01	0,93	1,57	1,32	1,83	1,48	1,64	0,96	2,57
Extr. Pyro - soude	24,48	44,68	29,93	23,78	54,56	18,59	21,19	46,38	24,43
dont A.F.	14,26	21,01	19,47	13,14	37,56	12,65	12,91	43,31	21,18
dont A.H.	10,22	15,67	10,36	10,64	17,00	5,94	8,28	3,07	3,25
Extr. Soude	5,22	3,36	3,05	3,21	3,05	2,32	3,55	3,21	2,60
Humine	69,28	51,03	65,54	71,69	40,58	77,61	73,62	49,45	70,41
AF/AH	1,40	1,85	1,88	1,23	2,21	2,13	1,56	14,11	6,52

Comme nous l'avions déjà constaté lors des études respirométriques, les variations qui apparaissent dans le comportement des divers composés ajoutés sont beaucoup plus significatives que celles dues aux extraits de litières (Tableau 42 et Figure 26).

b.- Particularités de l'humification pour chaque élément ajouté

- Humification de la molécule de glycine

Une forte majorité de la glycine humifiée l'est sous forme d'humine, c'est à dire la fraction la plus polymérisée, inextractible par les réactifs alcalins utilisés. En effet, dans chaque cas, environ 70 % de la radioactivité non minéralisée se retrouve dans l'humine, soit approximativement 2,5 à 3 fois plus que dans les alcalino-solubles (extraits $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 0,1 % - NaOH N/10 et NaOH N/10 additionnés). La fraction de la radioactivité restant hydrosoluble est toujours très faible (1 à 1,6 %).

Pour tenter de préciser le mode d'évolution de la glycine, nous avons eu recours à des hydrolyses et à des analyses chromatographiques. Il est certain que le principal intérêt d'un amino-acide est sa fonction aminée et l'idéal serait de pouvoir suivre l'azote du groupement NH_2 comme nous pouvons le faire ici avec le carbone du radical CH_2 . En effet, nous voyons l'évolution de l'atome de ^{14}C apporté sans être assuré dans tous les cas que l'azote introduit simultanément soit solidaire de cette évolution.

Ces analyses ont été effectuées uniquement dans le cas de la Callune puisque les autres végétaux n'apportent pas de variations significatives, et sur l'extrait pyrophosphate-soude pris dans son ensemble et sur l'humine (donc en présence de matière minérale).

Sur l'extrait alcalino-soluble, nous avons pratiqué une hydrolyse acide (HCl 6N à reflux pendant 16 heures). Toute la radioactivité présente dans cette fraction est hydrolysable et reste donc en solution après ce traitement. Avec l'humine, après cette première hydrolyse, nous en avons pratiqué une seconde plus drastique sur le résidu obtenu : mêmes conditions que la première, mais avec en plus 3 % d'eau oxygénée à 110 volumes. La première des hydrolyses libère 55 % de la radioactivité contenue dans l'humine, la seconde 6 % seulement, soit 9 fois moins. Au total, plus de 60 % du ^{14}C humifié est extractible par ces deux traitements.

Nous pouvons donc dire que la glycine n'est pas incorporée dans des édifices humiques très stables puisque 70 % du carbone marqué humifié peut être libéré sans difficultés notables.

Une chromatographie des acides aminés présents dans l'hydrolysate de l'extrait alcalinosoluble (pyrophosphate-soude) nous a permis de déterminer un certain nombre des molécules dans lesquelles se retrouve, à la fin de l'incubation, le ^{14}C apporté par la glycine. Une étude similaire n'a pu être menée à bien avec l'humine ; en effet, la grande quantité de sels divers solubilisés lors de l'hydrolyse, gêne considérablement les analyses ultérieures et les rend peu fiables.

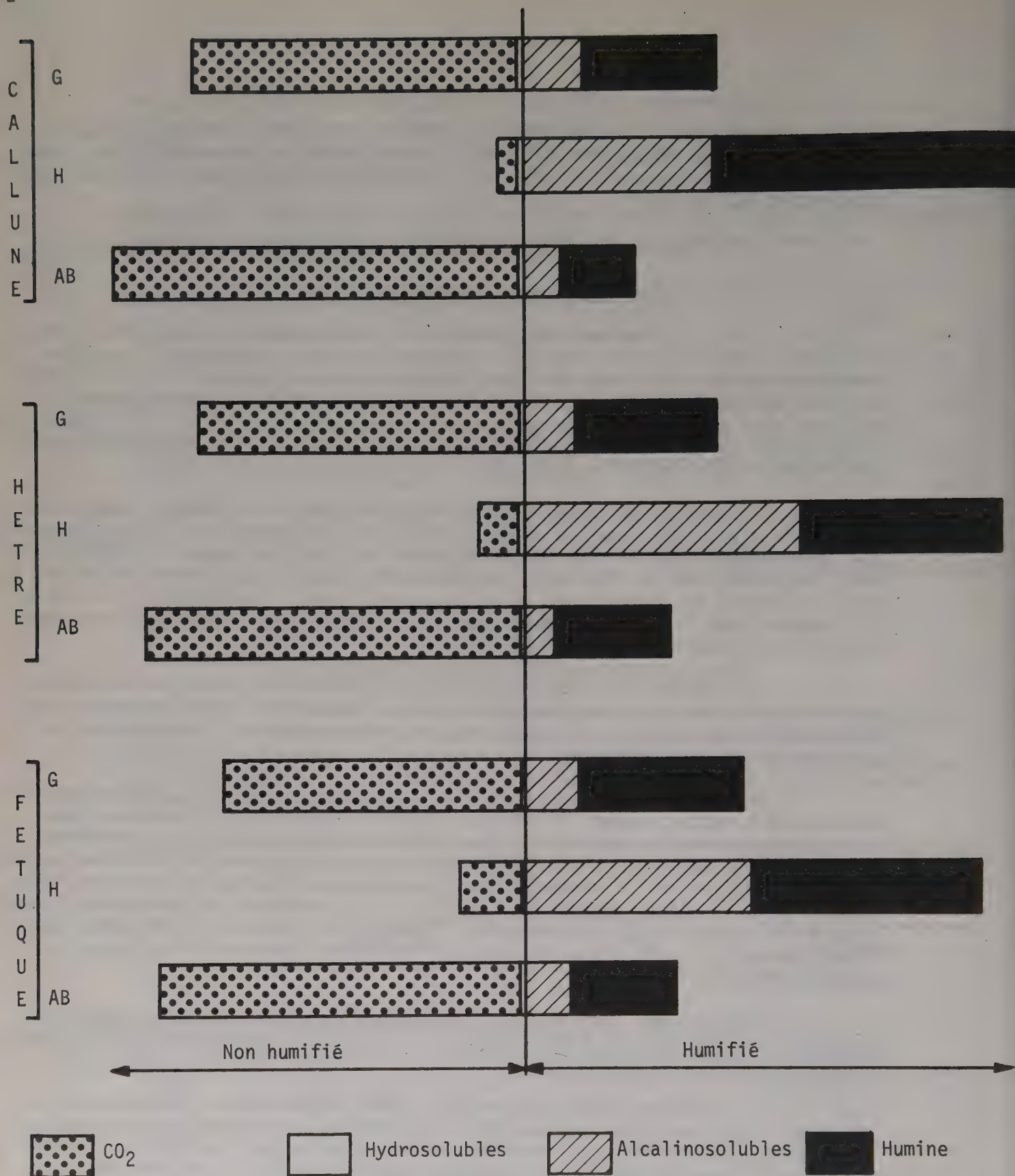


Figure 26.- Répartition du ^{14}C après l'incubation : G = glycine ; H = Hydroquinone ; AB = acide benzoïque

En résumé, l'humification de la glycine se fait en faveur d'une formation d'humine et les composés ainsi élaborés sont dans l'ensemble assez fortement détruits par l'hydrolyse acide. La glycine peut participer telle quelle à la synthèse biochimique ou physico-chimique de polymères humiques, ou subir au préalable un certain nombre de transformations sous l'influence de métabolisme microbien.

- Humification de la molécule d'hydroquinone

Contrairement à ce que nous observions pour la glycine, il n'y a plus avec l'hydroquinone de variation importante entre les alcalinosolubles et l'humine : nous retrouvons entre 40 et 50 % de la radioactivité minéralisée dans chacune de ces deux fractions. L'identité d'évolution d'un extrait de litière à un autre est dans ce cas moins grande qu'avec la glycine en effet, pour la Callune et la Fétuque, c'est l'humine qui contient le plus de ^{14}C ; pour le Hêtre, ce sont les alcalinosolubles ; cependant, dans tous les cas, nous constatons la même tendance de composés dont l'humification est moins poussée.

En outre, dans ce cas, les acides fulviques sont plus abondants, relativement aux acides humiques ; le rapport AF/AH est voisin de 2, et il atteint même 14 avec les extraits de Fétuque.

L'hydrolyse de la matière organique extractible avec le mélange pyrophosphate-soude montre qu'environ 60 % du ^{14}C contenu dans cet extrait est hydrolysable. Par ailleurs, les deux hydrolyses successives de l'humine ne libèrent qu'une faible partie de la radioactivité qu'elle contient : 19 % pour la première, 9 % pour l'hydrolyse oxydante. Le rapport des quantités ainsi libérées n'est plus ici que de 1,8 ; la seconde hydrolyse a encore une action très sensible après la première.

L'hydroquinone humifiée est donc localisée dans des composés assez stables puisque nous ne pouvons extraire que 40 % du ^{14}C incorporé. De plus, il semble qu'il existe plusieurs niveaux de solidité des composés ainsi formés ; en effet, l'hydrolyse oxydante est nettement plus efficace que pour la glycine.

L'analyse chromatographique est dans ce cas plus délicate du fait de l'abondance des composés existants : pour avoir une bonne résolution sur le chromatogramme, il faut faire deux migrations perpendiculaires, ce qui diminue la précision des comptages de radioactivité ; inversement, pour effectuer un comptage satisfaisant, il faut une chromatographie moins lisible ; nous avons retenu cette seconde solution.

L'extraction des phénols par l'acétate d'éthyle permet de recueillir 30 % de la radioactivité de l'alcalinosoluble hydrolysé ; les 60 % restant peuvent être localisés dans des ensembles polymérisés stables ou dans d'autres composés.

La bande de papier sur laquelle la chromatographie s'est développée a été découpée en morceaux afin de pouvoir compter la radioactivité à chaque niveau et établir une courbe représentant l'activité des composés en fonction de leur migration sur le chromatogramme (figure 27). Nous retrouvons le résultat précédent : si une partie de la radioactivité est localisée dans l'hydroquinone (15 à 20 %), le reste est réparti dans les autres composés phénoliques,

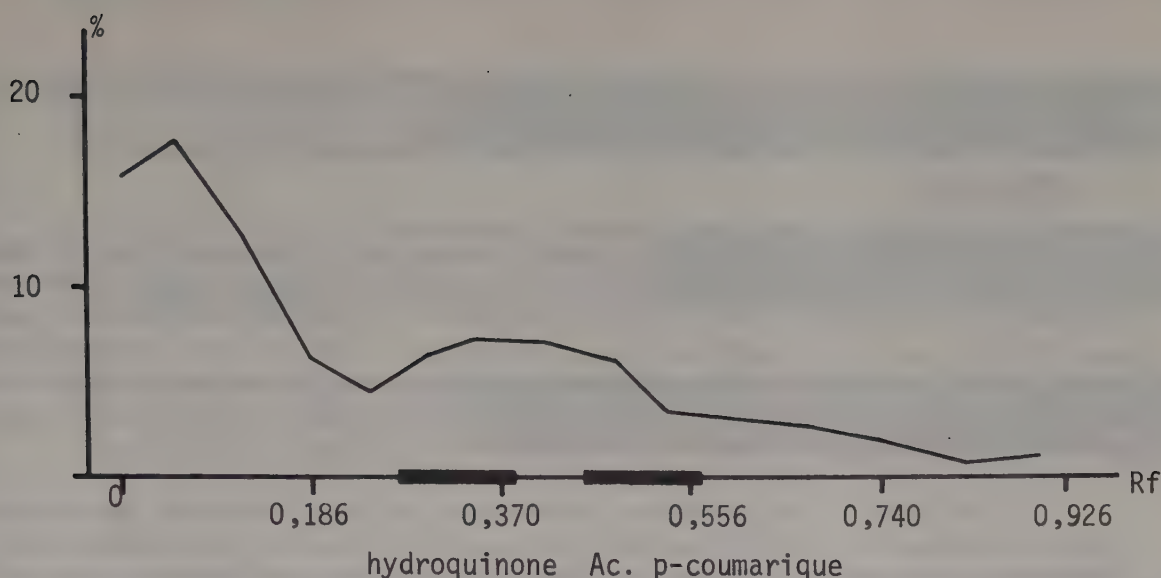


Figure 27 .- Répartition de la radioactivité dans les phénols de l'extrait pyro-soude hydrolysé (échantillon Callune + hydroquinone).

particulièrement semble-t-il dans l'acide p-coumarique, mais ce point demanderait à être précisé par une analyse beaucoup plus fine. En outre, nous constatons que plus de 35 % de la radioactivité reste au niveau de la dépose, elle est donc fixée dans des molécules plus encombrantes (pouvant comporter jusqu'à deux ou trois cycles) où l'hydroquinone peut être incorporée telle quelle.

L'hydroquinone humifiée se répartit de façon équivalente entre les alcalinosolubles et l'humine. Les composés humiques formés sont en majorité stables et résistent à l'action des hydrolyses. Nous retrouvons également les deux voies possibles pour l'humification : microbienne et biochimique ou physicochimique.

- Humification de la molécule d'acide benzoïque

Bien que l'hydroquinone et l'acide benzoïque comportent tous deux un cycle aromatique, leur humification n'est pas identique. En effet, l'acide benzoïque se retrouve en fin d'incubation, préférentiellement dans l'humine, les alcalinosolubles ne contenant que 2 à 4 fois moins de radioactivité que celle-ci. Ce type d'évolution ressemble à celui que nous avons observé avec la glycine : nous retrouvons ici encore la différence profonde de l'évolution de noyaux aromatiques ne comportant pas les mêmes groupements fonctionnels.

Par ailleurs, une hydrolyse sur l'extrait pyrophosphate-soude libère 96 % de la radioactivité présente. De l'humine, nous pouvons resolubiliser 30 % de la radioactivité par la première hydrolyse et rien par la seconde.

L'acide benzoïque a donc un comportement comparable à celui de la glycine en ce sens qu'il se retrouve surtout dans l'humine ; que les composés alcalinosolubles dans lesquels il est présent sont peu résistants ; et enfin que l'hydrolyse oxydante pratiquée sur l'humine est peu efficace. Par ailleurs, nous constatons également que, dans l'ensemble, les composés humifiés sont stables,

puisque 70 % ne sont pas libérables par les techniques que nous avons utilisées, comme c'est le cas avec l'hydroquinone.

V.- CONCLUSION

Nous avons vu dans un premier temps qu'il existait une différence quantitative entre les minéralisations -et corrélativement entre les humifications - des traceurs radioactifs ajoutés aux extraits de litières ; nous venons de voir que leur humification ne se faisait pas avec une intensité identique, même si les grands processus mis en oeuvre sont constants (évolution directe ou par l'intermédiaire du métabolisme microbien). Ces résultats sont regroupés dans la figure 28.

De plus, il se confirme maintenant que les molécules marquées étant ajoutées en excès, leur évolution n'est modifiée que de façon minime par les différents extraits de litières utilisés comme substrats carbonés. En effet, que ce soit pour la Callune, le Hêtre ou la Fétuque, nous retrouvons systématiquement en fin d'incubation une répartition analogue du ^{14}C .

La glycine et l'acide benzoïque, bien que n'ayant aucune parenté biochimique, ont des évolutions comparables. Une grande partie des molécules ajoutées est minéralisée et la part de celles qui sont humifiées est relativement faible. Au cours de l'humification, l'humine formée à l'aide de ces éléments est de 2 à 4 fois plus abondante que les composés alcalinosolubles moins évolués. Finalement, il ne reste dans le sol qu'une petite fraction du carbone apporté par ces molécules et celui-ci se retrouve principalement dans l'humine.

Inversement, l'hydroquinone est très peu minéralisée et se trouve humifiée presque en totalité. Au cours de cette humification, l'incorporation de l'hydroquinone se fait de façon équivalente dans les alcalinosolubles et dans l'humine. Le carbone apporté à un sol par l'intermédiaire d'une molécule d'hydroquinone reste à peu près intégralement dans ce sol et évolue de la même manière vers l'humine ou vers les alcalinosolubles.

Un cycle aromatique peut donc avoir dans un sol, un comportement totalement différent selon les groupements fonctionnels qui lui sont liés. Dans le cas présent, le cycle de la molécule d'acide benzoïque est détruit et fortement minéralisé ; il est donc très peu humifié et son comportement est comparable à celui de la courte chaîne aliphatique de la glycine. Par contre, le cycle de l'hydroquinone préservé, apparemment par ses hydroxyles, de l'intervention minéralisatrice des microorganismes, participe beaucoup plus à l'humification.

L'étude de la respirométrie au cours de l'incubation nous a montré que l'activité microbienne était nettement inhibée par l'hydroquinone et qu'elle était presque normale, voire stimulée avec la glycine et l'acide benzoïque, malgré, dans ce dernier cas, un certain retard au démarrage de la minéralisation. Par ailleurs, nous constatons que le carbone marqué de la glycine et de l'acide benzoïque est peu humifié, nous l'avons dit, mais que la partie qui l'est se retrouve surtout dans l'humine et est localisée dans des édifices relativement faciles à détruire, principalement dans le cas de la glycine. A l'inverse, le carbone apporté par l'hydroquinone se retrouve en quantités importantes dans toutes les fractions humiques et au sein d'assemblages apparemment beaucoup plus stables

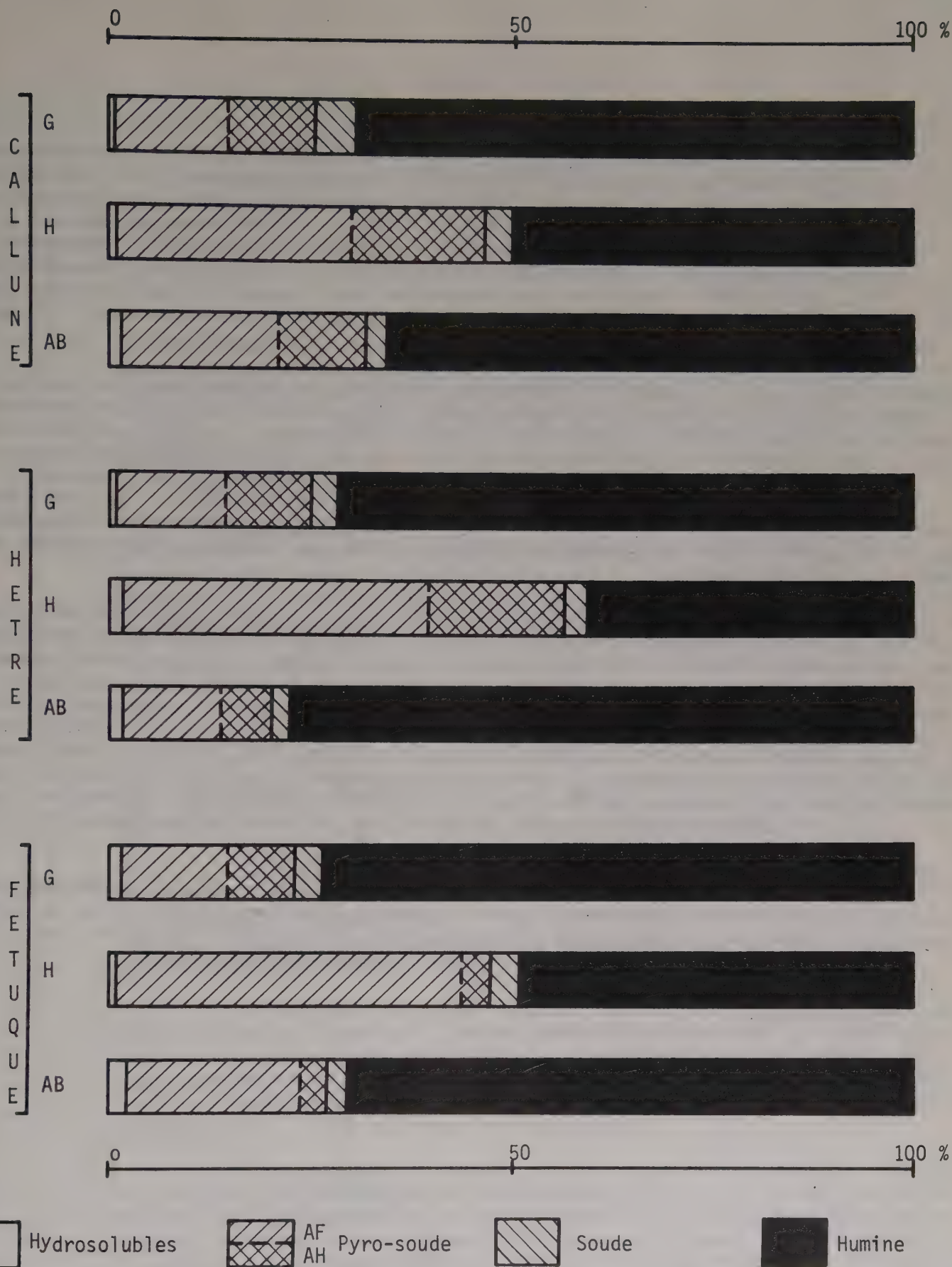


Figure 28.- Répartition du ^{14}C non minéralisé après l'incubation
 G : glycine ; H : Hydroquinone ; AB : Acide benzoïque

que les précédents.

Dans ces conditions, on peut se demander si l'intervention de la microflore ne favorise pas la formation d'humine proprement dite, aux dépens des autres fractions humiques ; mais les composés ainsi formés seraient relativement fragiles. A l'opposé, l'humification sous l'influence de facteurs d'ordre physicochimique plus que microbien aboutirait à l'apparition d'humine et d'alcalinosolubles en quantités comparables et à la formation de composés beaucoup plus stables. Rappelons que nous avons déjà invoqué des réactions physicochimiques et biochimiques pour expliquer la levée de l'inhibition due à l'hydroquinone.

Il est certain que ces résultats sont obtenus dans les conditions particulières d'une expérience de laboratoire, et que nous n'étions pas soumis aux variations intervenant dans la nature, concernant en particulier les facteurs climatiques, le milieu minéral, le potentiel d'oxydo-réduction et le pH. Cependant, nous pensons que les phénomènes observés peuvent être transposés à ce qui se passe dans le sol : les interactions phénols-protéines ou amino-acides, la toxicité de certains composés aromatiques sont des processus généraux qui existent et sont seulement modulés en fonction des conditions particulières du milieu ambiant.

L'un des aspects importants est par exemple l'aération du milieu. En effet, dans un milieu aéré, oxydant, la polymérisation des produits aromatiques sera facilitée. Ainsi, la disponibilité de ceux-ci pour une action tannante sera diminuée et la tendance sera plutôt à la formation d'un humus doux. Simultanément, l'activité de la microflore sera importante et nous assisterons dans ce cas, à une forte biodégradation. Inversement, dans un milieu réducteur, les phénols resteront à l'état libre, ils pourront donc manifester leur toxicité sur la microflore et limiter la biodégradation et exercer, en surface, leur pouvoir tannant, provoquant ainsi l'accumulation d'humine résiduelle ; de plus les phénols ont dans ce cas la possibilité de migrer en profondeur si le milieu est suffisamment réducteur.

Nous voyons ainsi que si l'analyse des composants importants d'une litière est nécessaire pour pouvoir connaître son évolution, la connaissance des conditions de milieu est aussi indispensable et il faut tenir compte de la concordance de ces deux groupes d'informations.

CONCLUSIONS

Le cycle de l'azote dans la matière organique des sols est un des facteurs essentiels de la fertilité, dans la mesure où la minéralisation plus ou moins active des composés azotés met à la disposition des plantes des quantités plus ou moins grandes de cet élément : on sait que les mull se montrent à cet égard plus favorable que les mor ou même que les moder. En fait, les espèces améliorantes sont celles qui fournissent les litières les plus riches en azote (C/N bas) par opposition à celles qui sont dites acidifiantes (C/N élevé).

Cependant si le rapport C/N des litières est important, il n'est pas le seul en cause et l'aspect uniquement quantitatif envisagé par ce rapport doit être modulé par des considérations d'ordre qualitatif. Par exemple, dans des conditions climatiques particulières (montagnes ou zones boréales) ce facteur n'intervient plus. D'une façon plus générale, ainsi que l'ont montré HANDLEY et COULSON, la minéralisation du carbone et de l'azote des litières est en grande partie conditionnée par la nature et la quantité des composés aromatiques contenus dans leurs hydrosolubles : certains sont peu actifs et n'entravent pas la minéralisation ; d'autres, au contraire exercent une action tannante vis-à-vis des protéines, ils inhibent leur minéralisation et sont capables de provoquer une véritable carence d'azote qui est en fait indépendante de la quantité de cet élément présente dans le milieu. Il est donc essentiel d'étudier la nature de ces composés, leur action tannante et leur évolution dans les sols au cours de l'humification.

Une partie de ces produits aromatiques prend naissance pendant l'humification, en particulier lors de la biodégradation de la lignine : ils ont été étudiés récemment par TOUTAIN (1974) et HANRION (1974) qui ont montré que le milieu minéral, suivant sa composition, pouvait soit favoriser, soit inhiber leur action.

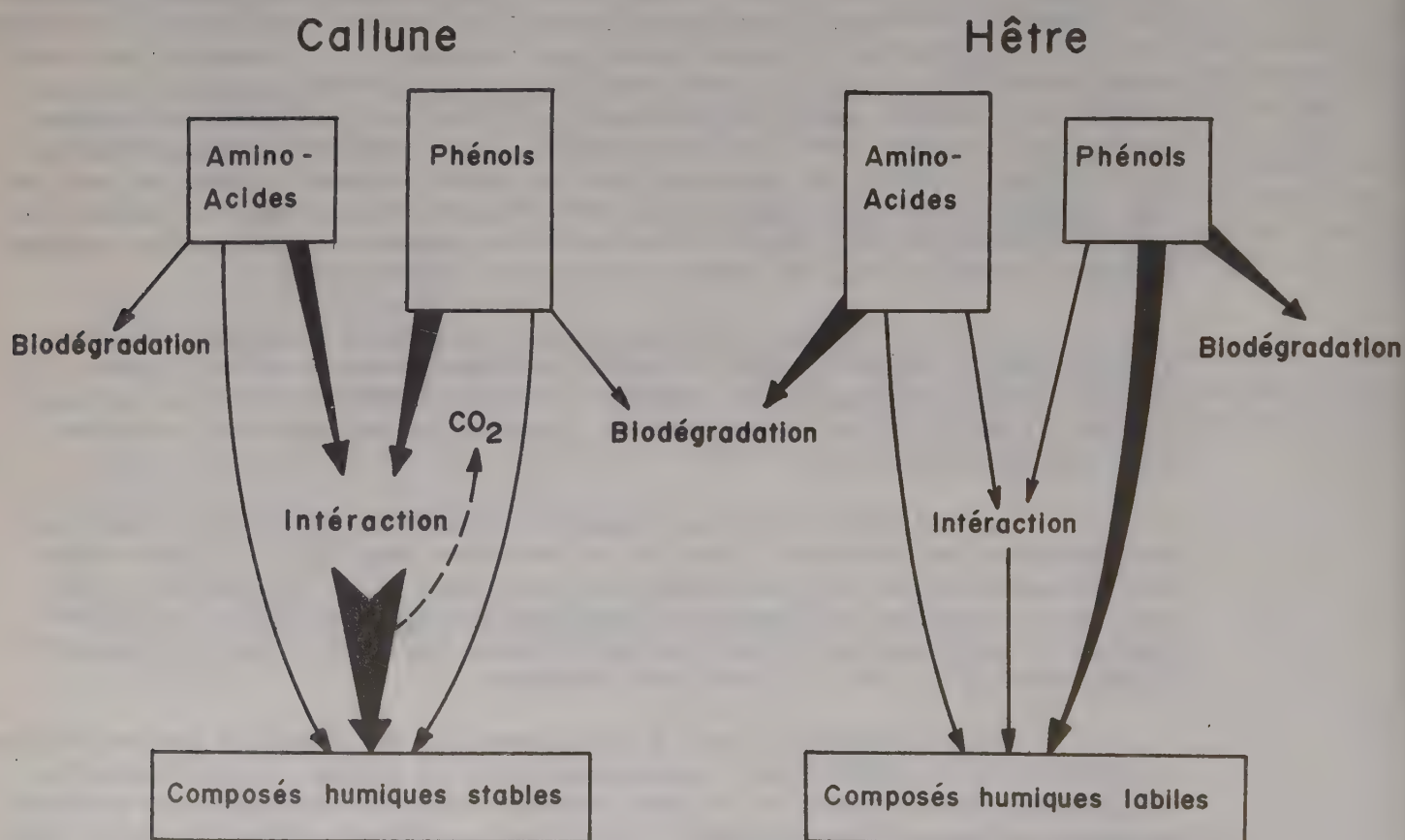
Par ailleurs, d'autres composés aromatiques préexistent dans les hydrosolubles de litières : lors de la chute des feuilles, ils sont apportés en quantité parfois considérable à la surface du sol et peuvent, suivant leur nature ou leur quantité, orienter de façon décisive, dès le départ de l'humification, l'activité microbienne dans une direction favorable ou défavorable : leur rôle est donc essentiel.

C'est pourquoi il nous a paru important de compléter les recherches de TOUTAIN et de HANRION par la comparaison de la nature et de l'évolution microbienne des composés de ce type présents dans les hydrosolubles extraits de deux litières, l'une nettement acidifiante (Callune), l'autre plutôt améliorante ou ambivalente (Hêtre) : cette étude était évidemment orientée vers la recherche des interactions de ces composés aromatiques avec les peptides et les acides aminés.

Dans un premier temps, nous avons procédé à l'analyse d'extraits hydrosolubles des deux litières en nous attachant surtout aux composés aromatiques et aminés, les acides aliphatiques ayant déjà été étudiés par BRUCKERT et les polysaccharides par GUCKERT. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la différence de nature des composés aromatiques apportés par ces deux litières : chez la Callune, les diphénols (hydroquinone, catéchol) sont abondants et ils ont tendance à s'unir de façon importante aux composés aminés ; par contre, chez le Hêtre, se trouvent surtout des composés monohydroxylés et méthoxylés. En outre, sur le plan quantitatif, la Callune libère nettement plus de composés aromatiques que le Hêtre, alors que nous constatons l'inverse pour les amino-acides.

Dans un second temps, nous avons suivi, par incubation en milieu liquide, l'évolution microbienne de ces extraits : chez le Hêtre, la tendance à la polymérisation, et particulièrement pour les composés aromatiques, est manifeste ; les milieux ayant un faible pouvoir tannant tendent donc à perdre rapidement ce pouvoir ; au contraire, chez la Callune ce caractère se maintient et même s'amplifie avec le temps.

A ce niveau, et en tenant compte des travaux effectués par GALLARDO (incubation des hydrosolubles en présence d'un sol), nous pouvons schématiser l'évolution de ces deux types de composés dans les deux cas que nous avons étudiés.



Il nous restait alors à vérifier expérimentalement le rôle de la nature des composés aromatiques et particulièrement des diphénols qui avaient semblé jouer un rôle déterminant au sein des extraits de Callune. Pour cela nous avons fait appel à des éléments marqués ajoutés aux hydrosolubles de Callune et de Hêtre, mais aussi de Fétuque, espèce nettement améliorante utilisée ici pour avoir une meilleure base de comparaison ; de plus, l'incubation s'est, cette fois, déroulée en présence de sol, afin de nous rapprocher davantage des conditions naturelles.

Les résultats de ces expériences ont confirmé de façon spectaculaire les prévisions : alors que l'acide benzoïque (comportant un cycle aromatique et un carboxyle) n'a que très faiblement inhibé les processus de minéralisation du milieu, il n'en est pas de même de l'hydroquinone (un cycle aromatique et deux hydroxyles) qui a freiné considérablement la minéralisation du carbone et donc, par voie de conséquence, celle de l'azote également.

Nos recherches ont donc confirmé les travaux antérieurs de certains auteurs, notamment COULSON et HANDLEY : nous retrouvons l'importance déterminante lors de l'humification, des composés aromatiques contenus dans les extraits de litières. Par ailleurs, ces résultats apportent un certain nombre de précisions sur ces processus :

1.- Le blocage des aminoacides par les phénols se produit, chez les espèces acidifiantes, à un stade très précoce de l'humification : l'action tannante se manifeste dans la litière au niveau du résidu végétal, elle n'est qu'accrue par la suite au cours des processus d'humification.

2.- il apparaît que dans les radicaux fixés sur les cycles aromatiques, les "OH" jouent un rôle particulier vis-à-vis des deux conséquences principales de la présence de produits aromatiques dans les litières : l'effet tannant et l'effet toxique.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS (W.A.), PERRY (D.R.), 1973 - The effect of pH on the incorporation of amino-acids into humic acid extracted from soil. J. of Soil Science, 24 (1).

ALEXANDROVA (L.N.), 1972 - Humification of plant residues and the nature of newly formed humic acids. Pochvovedeniye, 7, 37-45.

ANDREUX (F.), 1969 - Contribution à l'étude des processus de mélanification des autolysats végétaux. Thèse Doctorat de Spécialité, Fac. Sci., Nancy.

AUSSENAC (G.), BONNEAU (M.), LE TACON (F.), 1972 - Restitution des éléments minéraux au sol par l'intermédiaire de la litière et des précipitations dans quatre peuplements de l'Est de la France. Oecol. Plant., 7 (1), 1-21.

BARTHOLOMEW (W.V.), 1966 - The role of microorganisms in the formation and decomposition of organic compounds in soils. In "The use of isotopes in soil organic matter studies". Pergamon Press.

BENNETT (E.), 1949 - Soil Science, 68, 399.

BOCOCK (K.L.), GILBERT (O.), CAPSTICK (C.K.), TWINN (D.C.), WAID (J.S.), WOODMAN (M.S.), 1960 - Charges in leaf litter when placed on the surface of soils with contrasting humus types. I. et II. The J. of soil sci., 11 (1).

BREMNER (J.M.), 1965 - Organic nitrogen in soils. In "Soil Nitrogen" (W.V. BARTHOLOMEW et F.E. CLARK eds), American Society of Agronomy, Madison, Wis.

BRUCKERT (S.), 1970 - Influence des composés organiques solubles sur la pédogénèse en milieu acide. Thèse Doctorat d'Etat, Nancy.

BRUCKERT (S.), 1970 - Méthode d'analyse des acides organiques et des composés phénoliques présents dans le sol. C.N.R.S. - C.P.B., Doc. n° 9, Nancy.

BRUCKERT (S.), JACQUIN (F.), METCHE (M.), 1967 - Contribution à l'étude des acides phénols présents dans les sols. Bull. E.N.S.A.N., IX (2), 73-92

BRUCKERT (S.), JACQUIN (F.), 1969 - Interaction entre la mobilité de plusieurs acides organiques et de divers cations dans un sol à mull et dans un sol à mor. Soil Biol. Biochem., 1, 275-194.

BRUCKERT (S.), JACQUIN (F.), 1971 - Contribution à l'étude de la condensation des composés organiques au cours de l'humification en milieu podzolique. Bull. E.N.S.A.I.A., XIII (1), 28-35.

BRUCKERT (S.), TOUTAIN (F.), TCHICAYA (J.), JACQUIN (F.), 1971 - Influence des pluviollessivats de Hêtre et de Pin sylvestre sur les processus d'humification. Oecol. Plant., 6 (4), 329-339.

CAMPBELL (C.A.), PAUL (E.A.), RENNIE (D.A.), McCALLUM (K.J.), 1967 - Applicability of the carbon-dating method of analysis to soil humus studies. Soil Sci., 104 (3), 217-224.

CARBALLAS (Tarsy), ANDREUX (F.), JACQUIN (F.), 1971 - Répartition des principaux constituants d'un végétal marqué au ^{14}C dans les composés humiques d'un sol à mull. Bull. A.F.E.S., 3, 29-38.

- CHANDRAMCHAN (D.), PURUSHOTHAMAN (D.), KOTHANDARAMAN (R.), 1973 - Soil phenolics and plant growth inhibition. Plant and Soil, 39; 303-308.
- COULSON (C.B.), DAVIES (R.I.) LEWIS (D.A.), 1960 - Polyphenols in plant, humus and soil, I et II. J. of soil sci., 11, 20-39.
- CZERNY 1968 - Analytical studies on chemical groups in forest humus, with special reference to spuree humus. Tagber. dt. Akad. Land. Wiss. Beil., 84.
- DOMMERGUES (Y.), 1968 - Dégagement tellurique de CO₂. Mesure et signification. Ann. Inst. Pasteur, 115, 627-656.
- DORMAAR (J.F.), 1970 - Seasonal pattern of water soluble constituents from leaves of Populus. The J. of soil sci., 21 (1), 105-110.
- DUBIN (V.N.), FIL'KOV (V.A.), 1968 - Fractionation of humic acids in some moldavian soil by sephadex filtration. Soviet Soil Sci., 5, 639-645.
- DUCHAUFOR (Ph.), 1968 - L'évolution des sols. Masson Paris, éd.
- DUCHAUFOR (Ph.), 1970 - Précis de Pédologie, 3ème édition. Masson Paris éd. 481 p.
- DUCHAUFOR (Ph.), 1970 - Ecologie et humification. Cah. O.R.S.T.O.M. sér. Pédologie VIII (4), 379-391.
- DUCHAUFOR (Ph.), 1972 - Processus de formation des sols. Doc. C.R.D.P. Nancy, 182 p.
- DUCHAUFOR (Ph.), JACQUIN (F.), 1966 - Nouvelles recherches sur l'extraction et le fractionnement des composés humiques. Bull. E.N.S.A. Nancy, VIII (4), 23-25.
- DUCHAUFOR (Ph.), JACQUIN (F.), 1974 - Evolution des complexes organo-minéraux solubles dans les sols des Hêtraies acidiphiles. Communic. Xème Congrès Intern. Sci. du sol, Moscou.
- FILIP (Z.), HAIDER (K.), BEUTELSPACHER (H.), MARTIN (J.P.), 1974 - Comparisons of IR spectra from melanins of microscopic soil fungi, humic acids and model phenol polymers. Geoderma, II (1), 37-52.
- FLAIG (W.), 1950 - Zeitsch. f. Pflanzenernähr. u. Bodenk., 51, 193.
- FLAIG (W.), 1964 - Chemische Untersuchungen an Huminstoffen. Zeitsch. Chemie, 7, 253.
- FLAIG (W.), 1966 - The chemistry of humic substances. In "The use of isotopes in soil organic matter studies". Pergamon Press.
- FLAIG (W.), 1970 - Contribution à la connaissance de la constitution et de la synthèse des acides humiques. Conf. A.F.E.S. Paris.
- FLAIG (W.), 1969 - Advances in chemistry of humic substances. Landsforsch. Volkenrode 19.
- GALLALI (T.), 1972 - Etude statique et dynamique des polysaccharides et aminopolysaccharides au cours de l'humification. Thèse Spécialité, Nancy.
- GALLARDO (J.), 1974 - Evolution "in vitro" d'extraits hydrosolubles de litières forestières dans des minéraux acides. D.E.A. Nancy.
- GALLARDO (J.), SCHVARTZ (Ch.), JACQUIN (F.), 1974 - Evolution "in vitro" d'hydrosolubles de litières de Calluna vulgaris et de Fagus sylvatica au cours d'humification en milieu acide. Bull. E.N.S.I.A. Nancy, sous presse.
- GEORGE (T.), FELBECK (J.R.), 1971 - Structural hypothesis of soil humic acids. Soil Sci., VIII (1), 42-48.
- GUCKERT (A.), 1973 - Contribution à l'étude des polysaccharides dans les sols et leur rôle dans les mécanismes d'agrégation. Thèse Doctorat d'Etat, Nancy.
- GUCKERT (A.), ROGER (P.), JACQUIN (F.), 1968 - Contribution à l'utilisation des techniques radioactives pour l'étude de la matière organique des sols. Bull. E.N.S.A.I.A. Nancy, X (2), 69-100.
- GUILLET (B.), 1972 - Relation entre l'histoire de la végétation et la podzolisation dans les Vosges. Thèse Doctorat d'Etat, Nancy.

HAIDER (K.), FREDERICK (L.R.), FLAIG (W.), 1965 - Reactions between amino-acid compounds and phenols during oxydation. Plant and Soil, XXII, (1).

HAIDER (K.), MARTIN (J.P.), 1967 - Synthesis and transformation of phenols compounds by Epicoccum nigrum in relation to humic acid formation. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 31 (6).

HANDLEY (W.R.C.), 1954 - Thèse Forestry Commission, Londres, 23, 116 p.

HANDLEY (W.R.C.), 1961 - Plant and soil, 15 (1), 37.

HANRION (Myriam), 1974 - Contribution à l'étude de l'évolution des hydrosolubles organiques de Hêtre, en milieu acide. Thèse Spécialité, Nancy.

HANSEN (E.H.), SCHNITZER (M.), 1966 - The alkaline permanganate oxydation of Danish illuvial organic matter. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 30 (6).

HANSEN (E.H.), SCHNITZER (M.), 1967 - Nitric oxydation of Danish Illuvial organic matter. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 31 (1).

HARBORNE Biochemistry of humic compounds

HARDISSON (C.), SALA-TREPAT (J.M.), STANIER (R.Y.), 1969 - Pathways for the oxydation of aromatic compounds by Azotobacter. J. Gen. Microbiol., 59, 1-11.

HAYES (A.J.), 1965 - Studies on the decomposition of coniferous leaf litter. I. Physical and chemical changes. J. Soil Sci., 16, 121-140.

HAWORTH (R.D.), 1971 - The chemical nature of humic acid. Soil Sci., VIII (1), 71-79.

HOYT (P.B.), 1971 - Fate of chlorophyll in soil. Soil Sci., VIII (1), 49-53.

HUC (A.Y.), 1973 - Contribution à l'étude de l'humus marin et de ses relations avec les kérogènes. Thèse Docteur Ingénieur, Nancy.

JACQUIN (F.), 1963 - Contribution à l'étude des processus de formation et d'évolution de divers composés humiques. Thèse Doctorat d'Etat, Nancy.

JACQUIN (F.), BRUCKERT (S.), 1965 - Identification et évolution des acides hydrosolubles de deux litières forestières. C.R. Acad. Sci. Paris, 260.

JACQUIN (F.), BRUCKERT (S.), NGUYEN QUAT HAO, 1971 - Mise au point de l'utilisation des gels Sephadex pour le fractionnement de composés humiques. Bull. A.F.E.S., 2, 9-15.

JENKINSON (D.S.), 1965 - Studies on the decomposition of plant materials in soil. I. Losses of carbon from ¹⁴C labelled Ray-grass incubated with soil in the field. J. of Soil Sci., 16, 104-115.

JENKINSON (D.S.), 1965 - Experimental pedology. E.G. Hallsworth and D.V. Crawford Eds. Butterworth, London.

JOHNSTON (H.M.), 1964 - The relationship of brown-humus to lignin. Plant and soil, 2.

JUNG (G.), BRUCKERT (S.), DOMMERGUES (Y.), 1968 - Etude comparée de diverses substances hydrosolubles extraites de quelques litières tropicales et tempérées. Oecol. Plant., III, 237-258.

KONONOVA (M.M.), 1966 - Soil organic matter. 2ème édition. Pergamon Press, London.

KONONOVA (M.M.), 1968 - Humus of the main soils types and soil fertility. In : "Organic matter and soil fertility", Pontif. Acad. Sci. Scripta Varia, 32.

KONONOVA (M.M.), 1972 - Current problems in the study of soil organic matter. Pochvovedeniye, 7, 27-36.

LAATSCH (W.), SCHLICHTING (E.), 1953 - Zeitsch. f. Pflanzenernähr. u. Bodenk., 60, 50.

LAURENT (M.), 1972 - Cycle biologique de l'azote au sein des étangs: rôle des facteurs écologiques. Thèse Doctorat d'Etat, Bordeaux.

- MAILLARD (L.C.), 1916 - Synthèse des matières humiques par action des acides α -aminés sur les sucres réducteurs. Ann. Chimie, V (9), 258.
- MAILLARD (L.C.) (1917 - Identité des matières humiques de synthèse avec les matières humiques naturelles. Ann. Chimie, VII (9), 113.
- MAKSIMOVA (A.Ye), 1973 - The chemical composition of humic acids in forest litter. Soviet soil sci., 5 (2).
- MANGENOT (F.), JACQUIN (F.), METCHE (M.), 1965 - A propos des interactions plantes-sols. I. Les exsudats foliaires peuvent-ils être une source de substances humiques. Oecologia Plant., I, 79-102.
- MANSKAYA (S.M.), KODINA (L.A.), 1968 - Aromatic structures of lignins and their role in the formation of humic-acids. Soviet soil sci., 8, 1102-1107.
- MARTIN (J.P.), HAIDER (K.), 1971 - Microbial activity in relation to soil humus formation. Soil Science, III (1).
- MAYAUDON (J.), EL HALFAWI (M.), BATISTIC (L.), 1973 - Oxidoreductive degradation of DL-3 (3,4-dihydroxyphenyl) alanine by soil minerals and clays. J. of soil sci., 24 (2), 182-192.
- MAZUR (T.), RACHINSKIY (V.V.), 1964 - Study of changes in amino-acids in soils. Experiments with 2-C^{14} glycine. Soviet soil sci., 3.
- McLAREN (A.D.), PETERSON (G.H.), 1967 - Soil Biochemistry. I. M. Dekker, N.Y.
- McLAREN (A.D.), SKUJINS (J.), 1971 - Soil Biochemistry. II. M. Dekker. N.Y.
- MERLET (D.), 1971 - Mise au point technique concernant l'extraction et la caractérisation des composés organiques présents dans les sols. C.N.R.S. - C.P.B. Nancy, Doc. 15.
- MOORE (S.), STEIN (W.H.), 1964 - A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino-acids and related compounds. J. Biol. Chem., 211, 907-913.
- MUNDRA (M.C.), BHANDARI (G.S.), SRIVASTVA (O.P.), 1973 - Studies on mineralisation and immobilisation of nitrogen in soil. Geoderma, 9 (1), 27-34.
- NEFEDOVA (L.N.), LARINA (N.K.), KASATOCHKIN (V.I.), 1970 - Biochemical condensation of pyrocatechol with amino-acids. Soviet soil sci., 2 (4), 417-425.
- NEUNYLOV (B.A.), KHAVKINA (N.V.), 1968 - Studies of the rate of decomposition and conversion processes of organic matter tagged with ^{14}C in the soil. Soviet soil sci., 2, 234-239.
- NGUYEN QUAT HAO, METCHE (M.), 1974 - Repérage des pics de chromatographie en phase gazeuse. Application au fractionnement des composés phénoliques et acides organiques. Bull. E.N.S.A.I.A. Nancy (sous presse).
- NYKVIST (N.), 1959 - Leaching and decomposition of litter. Oikos, 10 (2), 191-224.
- NYKVIST (N.), 1962 - Leaching and decomposition of litter. V. Experiments on leaf litter of Alnus glutinosa, Fagus sylvatica and Quercus robur. Oikos, 13 (2).
- OGNER (G.), 1970 - Extraction and hydrolysis of raw humus. Soil Science, 109.
- OGNER (G.), 1973 - Oxydation of non hydrolysable humic residue, and its relation to lignin. Soil Science, 116 (2).
- PIPER (J.), POSNER (A.M.), 1968 - On the amino-acids found in humic acid. Soil sci., 106 (3), 188-192.
- PIPER (J.), POSNER (A.M.), 1972 - Humic acid nitrogen. Plant and Soil, 36, 595-598.
- POCHON (J.), DE BARJAC (H.), 1958 - Traité de microbiologie des sols. Dunod, Paris éd.
- PRASAD (B.), SINHA (H.), 1969 - Studies of ammonium in Bihar soils. III. Ammonium fixation in relation to soil organic matter. Indian J. agric. Chem., 2, 6-12.

- REMACLE (J.), VANDERHOVEN (Ch.), 1973 - Evolution of the carbon and nitrogen contents in incubated litters. Plant and Soil, 39, 201-203.
- RIBBONS (D.W.), 1966 - The microbiological degradation of aromatic compounds. Ann. Reports Chem. Soc., 62, 445-468.
- RIFFALDI (R.), SCHNITZER (M.), 1973 - Effects of 6N HCl hydrolysis on the analytical characteristics and chemical structure of humic acids. Soil Science, 115 (5).
- ROGER (P.), BRUCKERT (S.), JACQUIN (F.), 1969 - Etude de l'évolution de l'acide citrique dans un podzol humo-ferrugineux et dans un sol brun lessivé. Science du sol, 2 (Suppl. Bull. A.F.E.S.).
- SCHNITZER (M.), DESJARDINS (J.G.), 1970 - Alkaline permanganate oxidation of methylated and unmethylated fulvic acid. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 34 (1), 77-79.
- SCHOBINGER (U.), 1958 - Chemische Untersuchungen über die Umwandlung von Weizenstrohlignin im Laufe der Verrottung. Verlag H. Schellenberg, Winterthur (80 p).
- SEIFERT (J.), 1970 - The influence of temperature on the number of bacteria on soil. Acta Universalis Carolinae Biologica, 6, 471-473.
- SIMONART (P.), BATISTIC (L.), MAYAUDON (J.), 1967 - Isolation of protein from humic acid extracted from soil. Plant and Soil, XXVII (2), 153-161.
- SINHA (M.K.), 1972 - Organic matter transformation in soils. III. Nature of amino-acids in soil incubation with C¹⁴ tagged oats roots under aerobic and anaerobic conditions. IV. Aromatic compounds in fulvic acid of soil incubated with C¹⁴ tagged oats roots under aerobic and anaerobic conditions. Plant and soil, 37 (2), 265-273 et 273-283.
- SMITH (I.), 1962 - Chromatographic and electrophoretic techniques. Interscience publishers Inc. N.Y.
- SØRENSEN (L.H.), 1972 - Role of amino-acide metabolites in the formation of soil organic matter. Soil biol. biochem., 4, 245-255.
- SOUCHIER (B.), 1971 - Evolution des sols sur roches cristallines à l'étage montagnard (Vosges). Thèse Doctorat d'Etat, Nancy.
- SWIFT (R.S.), POSNER (A.M.), 1972 - Autoxidation of humic acid under alkaline. The J. of soil science, 23 (4), 381-393.
- TOUTAIN (F.), 1972 - Etude comparée de deux Hêtraies sur grès rhétien : divergences pédoclimatiques et biochimiques. Bull. E.N.S.A.I.A. Nancy, XIV (1) 103-116.
- TOUTAIN (F.), 1974 - Etude écologique de l'humification dans les Hêtraies acidiphiles. Thèse Doctorat d'Etat, Nancy.
- TOUTAIN (F.), HANRION (Myriam), BRUCKERT (S.), JACQUIN (F.), 1975 - Evolution comparée de la matière organique hydrosoluble dans un sol brun et dans un podzol sous Hêtre : divergences et mécanismes. En préparation.
- TRANCHANT (J.), 1968 - Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Masson Paris, éd.
- VALA (M.), GUCKERT (A.), JACQUIN (F.), 1972 - Formation de complexes entre acides humiques et montmorillonite. I. Mécanismes d'adsorption d'acides humiques ¹⁴C en fonction des cations. II. Etude de la stabilité des complexes acides humiques ¹⁴C-montmorillonite à l'égard des réactifs d'extraction chimiques. Bull. E.N.S.A.I.A., XIV (2), 227-238 et 239-244.

VAN SCHREVEN (A.C.), 1968 - A comparison between nitrogen mineralisation in the laboratory and in the field by means of the polyethylene bag method. Progress in soil biodynamics and soil productivity. A. Primavesi ed. Palloti, Santa-Maria, Brazil. Réf. Biblio. Soils and Fertil., 1970, 33 (1), n° 140.

VARGA (J.M.), NEUJAHN (H.Y.), 1970 - Isolation from soil of phenol-utilizing organisms and metabolic studies on the pathways of phenol degradation. Plant and soil, 33 (3), 565-572.

VEDY (J.C.), BRUCKERT (S.), 1970 - Evolution saisonnière de composés organiques solubles en relation avec divers processus biochimiques d'humification. Pédologie, Gand, XX (2), 132-152.

VEDY (J.C.), 1973 - Relation entre le cycle biogéochimique des cations et l'humification en milieu acide. Thèse Doctorat d'Etat, Nancy.

VOLK (B.G.), SCHNITZER (M.), 1973 - Chemical and spectroscopic methods for assessing subsidence in Florida histosols. Soil Sci. Proceed., 37 (6), 886-888.

WAGNER (G.H.), MUTATKAR (V.K.), 1968 - Amino components of soil organic matter formed during humification of ^{14}C glucose. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 32.

NOM DE L'ETUDIANT : SCHVARTZ Christian

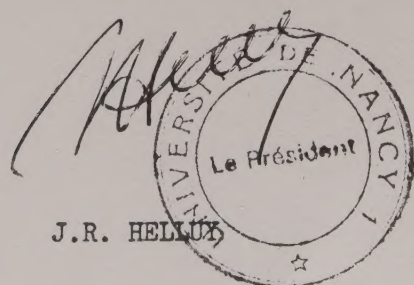
NATURE DE LA THESE : DOCTEUR INGENIEUR

VU, APPROUVE

& PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 4-12.74.

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



J.R. HELLOU

